Vol. 12 1941

ARQUIVOS
DO
INSTITUTO BIOLOGICO





SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Superintendente do Instituto Biologico, Caixa postal 2821, São Paulo, Brasil.

Superintendente - Prof. Dr. H. da Rocha Lima

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Superintendente do Instituto Biologico, P. O. Box 2821 - São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO 20$000

Vol. 12 1941

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMARIO

(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

———o———

Vol. 12 — Art. 1 Setembro de 1941

TREZE NOVAS ESPECIES DE "ELSINOË" DO BRASIL *

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins

Do Instituto Biologico de São Paulo e do Bureau of Plant Industry, Department of Agriculture, dos Estados Unidos

Com as estampas 1-17

INTRODUÇÃO

Em trabalho recente (4) foram descritas sete novas especies de *Elsinoë* ou de *Sphaceloma,* forma conidiana desse genero das Miriangiales. Essas especies são todas do Brasil, onde foram descobertas entre 1936 e 1939. Todas se encontram em plantas hospedeiras de importancia económica.

O presente trabalho contem a descrição de um grupo de 13 novas especies de *Elsinoë* descobertas no Brasil durante o mesmo periodo. Dessas, uma especie foi descoberta no Jardim Botanico do Rio de Janeiro, durante a visita oficial dos membros da Primeira Reunião Sul-Americana de Botanica, que se deu em Outubro de 1938, outra em São Gonçalo, Estado do Rio, durante a excursão oficial dos mesmos delegados a Cabo Frio, e uma terceira em Iguassú, Estado do Rio de Janeiro. As dez outras especies foram encontradas no Estado de São Paulo [1].

Com exceção de um membro da familia das Leguminosas, os hospedeiros das especies descritas no presente trabalho pertencem a familias diferentes das que constam do trabalho anteriormente citado; e um certo numero dessas plantas hospedeiras são silvestres.

Um hospedeiro silvestre de interesse especial é o *Blechnum serrulatum,* primeiro e único membro da familia das Polipodiaceas em que já se encontrou uma *Elsinoë.* Esta planta cresce nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisferios. Entre outros hospedeiros desse grupo destaca-se pela importancia económica o *Achras sapota,* o conhecido sapotizeiro. Esta planta, nativa dos trópicos americanos, é, como se sabe, extensivamente cultivada nos climas tropicais, sendo a sua fruta comestivel grandemente estimada. Outros hospedeiros das especies descritas no presente trabalho são a *Boehmeria*

---

* Trabalho apresentado para o volume jubilar do Prof. Rocha Lima. (Arq. Inst. Biol. vol. 11 1940) em Setembro de 1940.

(1) Os autores consignam aqui os seus agradecimentos ás pessoas que contribuiram com especimens das especies que descobriram, conforme está mencionado ao pé das descrições técnicas, a Miss Edith Cash que, como fizera para publicações anteriores, dos autores, traduzio as diagnoses para o latim e a F. C. Hoehne pela classificação de diversos hospedeiros.

caudata, igualmente nativa dos trópicos americanos; *Cryptostegia grandiflora*, planta ornamental originaria do Velho Mundo; *Cordia sellowiana* e *Tournefortia paniculata*, especies nativas do Brasil; *T. breviflora*, nativa dos trópicos americanos; *Verbena bonariensis*, das regiões tropicais, e tres membros das Compostas, todos nativos do Brasil: *Calea pinnatifida*, *Ambrosia polystachya* e *Moquinia polymorpha*.

Foram feitos isolamentos em cultura pura das especies parasitas de *Boehmeria*, *Achras*, *Tournefortia*, *Verbena*, *Ambrosia* e de uma Dicotiledonea.

1. *Elsinoë blechni* n. sp.

Estampa 1

Manchas das frondas, epífilas, distribuidas ao longo das margens dos foliolos, com contorno semi-elíptico, na face superior com centro seco, branco-acinzentado *(pallid neutral gray* [2]) e zona preta arroxeada *(anilin black)* periférica, que empalidece exteriormente, confundindo-se insensivelmente com a côr normal do limbo, mostrando apenas uma ligeira descoloração, na face inferior, medindo de 1 a 5 mm. no seu maior comprimento, e 0,5 a 3 mm. de largura.

Ascomas vistos na superficie das manchas como corpos pretos, mais ou menos irregulares, errumpentes, ligeiramente salientes, medindo até 0,2 mm. de diametro; em secção transversal intraepidermicos, diretamente assentados sobre as celulas externas do mesofilo, sem prosenquima basal desenvolvido, pulvinados ou aplanados, com parte superior plana, feitos de uma parte central pseudoparenquimatosa hialina, coberta de uma camada de pequenas celulas escuras constituindo um epitecio, quasi completamente cheios de ascos, medindo 90-200 x 15-50 μ. Ascos distribuidos em uma camada nos ascomas chatos, em várias nos ascomas espessos, globosos ou piriformes, com paredes espessas, principalmente no ápice, medindo 20-24 x 14-17 μ, contendo geralmente 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, constritos no septo mediano, com as duas celulas superiores mais grossas que as inferiores, medindo 10-12 x 4-6 μ.

Maculis per pinnas frondorum distributis, epiphyllis, semi-ellipticis, griseis margine lato fusco, hypophyllis minus distinctis, 1-5 x *0,5-3 mm.; ascomatibus atris, intraepidermicalibus, epithecio inconspicuo, 90* x *200* μ *in diam., 15-50* μ *crassis, stromate ascis fere impleto; ascis globosis vel obpyriformibus, 20-24* x *14-17* μ*; ascosporis hyalinis, 3-septatis, ad septum medium constrictis, loculis duobus superioribus majoribus quam inferioribus, 10-12* x *4-6* μ.

Sobre frondas, causando uma antracnose de *Blechnum serrulatum* RICH. (Polipodiaceas) em São Vicente, Estado de São Paulo, Brasil, 11 de Abril de 1936. A. E. JENKINS (tipo). Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 2183, e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture,

---

(2) As côres são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês é baseada em: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature, 43 pp. 1912.

Washington, D. C. n.º 72790, e em Conceição de Itanhaem, Estado de São Paulo, Março de 1929, L. B. SMITH (Fragmento do especimen do Gray Herbarium, Flora of Brazil, São Paulo State, n.º 2052, fornecido pelo U. S. National Herbarium em 28 de Abril de 1940), Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3722, e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73545.

2. *Elsinoë boehmeriae* n. sp.

Estampa 2

Manchas das folhas, pequenas, medindo 0,2 a 0,8 mm. de diametro, inconspicuas, mais ou menos irregulares, visiveis nas duas faces da folha, com a parte central seca, reduzida a uma membrana translúcida, pergaminhosa, branca ou pardo-clara *(vinaceous fawn)*, limitada por uma linha marginal pardo-escura *(clove brown)* que na periferia se torna mais clara, confundindo-se pouco a pouco com o verde normal do tecido são da folha.

Ascomas bem visiveis na superficie branca das lesões como pequenos corpos escuros, arredondados ou irregulares, em secção transversal pulvinados, errumpentes, medindo aproximadamente 100 μ de diametro e 50 μ de altura, feitos de um pseudoparenquima hialino coberto de um epitecio composto de duas a tres camadas de células escuras, achatadas. Ascos globosos, ou ovoides, imersos no pseudoparenquima dos ascomas, com paredes espessas, medindo 27-31 x 22-28 μ contendo em regra 8 ascosporos munidos de 3 septos, ocasionalmente de 4 septos transversais, com septo longitudinal ou mais ou menos obliquo em uma ou mais de suas células, bem constritos no septo mediano, com a metade superior mais grossa que a inferior, medindo 16-19 x 7-9 μ.

Maculis in foliis parvis, inconspicuis, 0,2-0,8 mm. in diam., plus minusve irregularibus, amphigenis, parte centrali membranacea, pellucida, albis vel vinaceo-cervinis, linea brunnea marginatis; ascomatibus parvis, epiphyllis, fuscis, desuper visis rotundis vel irregularibus, intraepidermicalibus, pulvinatis, erumpentibus, 100 μ in diam., 50 μ crassis, epithecio fusco; ascis globosis vel obpyriformibus, 27-31 x *22-28 μ; ascosporis plerumque 3-, interdum 4-septatis, loculis singulis vel pluribus longitudinaliter vel oblique septatis, ad septum medium valde constrictis, dimidia superiori majori quam inferiori, 16-19* x *7-9 μ.*

Sobre folhas, causando uma antracnose de *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceas) Tieté, Estado de São Paulo, Brasil, 8 de Fevereiro de 1939. A. S. COSTA. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Agronomico de Campinas n.º 2754. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 3231 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73149.

3. *Elsinoë kramerii* n. sp.

Estampa 3

Manchas das folhas, mais ou menos irregulares, medindo 0,8 a 4 mm. de diametro, salientes, quasi sempre epífilas, ordinariamente visiveis somente de um dos lados das folhas, esparsas ou então numerosas e confluentes, cobrindo extensas areas das folhas, pardas *(drab a vinaceous buff)*, com superficie rugosa e irregular, produzindo um franzimento ou uma distorsão do limbo. Manchas dos pecíolos e galhos ás vezes muito grandes, levemente salientes nas margens, que são irregulares, com area central deprimida, medindo de 1 a 5 mm. de diametro.

Ascomas vistos na superficie das lesões como corpos pardos, irregulares, não muito bem definidos, em secção transversal pulvinados, aplanados, tornando-se errumpentes, com estrutura pseudoparenquimatica ou prosenquimatica, de côr hialina ou amarelada, apenas diferenciados exteriormente por uma coloração mais escura do tecido, formando um epitécio mal definido, medindo 200 a 300 μ de diametro e 40 a 60 μ de altura, contendo ascos irregularmente distribuidos no pseudoparenquima em que se acham imersos. Ascos globosos ou subpiriformes, com paredes espessas, medindo 17-23 x 15-23 μ, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, ocasionalmente com a célula mediana superior dividida por um septo longitudinal ou ligeiramente obliquo, medindo 11-16 x 5-7 μ.

Maculis in foliis plus minusve irregularibus, 0,8-4 mm. in diam., plerumque epiphyllis, elevatis, generaliter in pagina unica evidentibus, conspersis vel numerosis et confluentibus et areas magnas tegentibus, sordidis vel vinaceo-alutaceis, laminam plicantibus vel distorquentibus; maculis in petiolis et in caulibus margine leniter elevatis, 1-5 mm. in diam.; ascomatibus inconspicuis, superficialibus, depresso-pulvinatis, erumpentibus, epithecio indefinito, 200-300 μ in diam., 40-60 μ crassis; ascis globosis vel obpyriformibus, 17-23 x 15-23 μ; ascosporis hyalinis, 3-septatis, 11-16 x 5-7 μ.

Sobre folhas, pecíolos e galhos, causando uma verrugose de uma Leguminosa nativa (Papilionadas) São Gonçalo, Estado do Rio de Janeiro. 16 de Outubro de 1938. M. Kramer. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3037 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73148.

4. *Elsinoë rochalimai* n. sp.

Estampa 4

Manchas ordinariamente hipófilas, visiveis de um só lado da folha, mais ou menos irregulares, com 0,5 a 12 mm. de diametro, frequentemente bem delimitadas de um lado por uma das nervuras, ocasionalmente confluentes ao longo das nervuras, ligeiramente salientes, cobertas de finas protuberancias que são as frutificações do fungo e que dão um aspéto rugoso ás manchas, de côr marron-escura *(seal brown)*.

Ascomas vistos superficialmente como numerosos corpos errumpentes sob a epiderme rompida, densamente agregados, redondos ou ovalados, de côr pardo-escura, e, em secção transversal, intraepidérmicos, pulvinados, errumpentes, com 90

a 220 μ de diametro e 45 a 90 μ de espessura, feitos de um pseudoparenquima mais ou menos homogeneo, amarelo, apenas diferenciado externamente numa camada ligeiramente mais escura, que constitue um epitecio mal definido, limitados pelas beiras levantadas da parede externa da epiderme rompida. Ascos imersos no pseudoparenquima, aglomerados em uma ou duas camadas irregulares, intimamente em contato uns com os outros, globosos ou piriformes, com paredes espessas, medindo 23-37 x 17-25 μ, contendo até 8 ascosporos hialinos, com 3 septos transversais e ocasionalmente um septo longitudinal em uma das células medianas, geralmente retos, medindo 15-21 x 6-9 μ.

Maculis plerumque hypophyllis, in pagina unica evidentibus, plus minusve irregularibus, saepe in latero unico nervo folii limitatis, leniter elevatis, ex ascomatibus asperulatis; ascomatibus numerosis, dense aggregatis, fuscis, desuper visis rotundatis vel ovalibus, ex epidermide erumpentibus, intraepidermicalibus, pulvinatis, 90-220 μ in diam., 45-90 μ crassis, epithecio fusco; ascis 1-2 seriatis, globosis vel obpyriformibus, 23-37 x 17-25 μ; ascosporis transverse 3-septatis, interdum loculo uno medio longitudinaliter septato, 15-21 x 6-9 μ.

Sobre folhas, causando uma verrugose de uma Dicotiledonea nativa (?Dileniaceas), Eldorado, Nova Represa, Estado de São Paulo, Brasil. 21 de Fevereiro de 1937. A. A. BITANCOURT. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2432 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73142.

5. *Elsinoë lepagei* n. sp.

Estampa 5

Manchas das folhas, irregulares, muito salientes, de contorno bem delimitado, esparsas, medindo 0,5 a 2 mm. de diametro, ou mais ou menos confluentes e reunidas em areas de extensão variavel, de côr cinzento-avermelhada *(purplish gray)*, muitas vezes providas de uma fissura circular de seus tecidos superficiais, concentrica em relação á margem da lesão ou então de fissuras radiais, que se estendem em direção á margem, a qual nesse ponto se estende exteriormente em um lobo mais ou menos marcado, acompanhando a fissura. Nos galhos as manchas são pequenas, numerosas, ovaladas, medindo em geral 0,5 por 1 mm., ligeiramente salientes e de superficie rugosa.

Ascomas vistos superficialmente como corpos geralmente arredondados, escuros, pulvinados, errumpentes, com 45 a 80 μ de diametro, em secção transversal como pequenas massas de pseudoparenquima hialino, errumpentes, pulvinadas, até hemisféricas, com camada externa ou epitecio escuro, de 2 a 4 μ de espessura, cheias de ascos irregularmente distribuidos em 2 ou 3 camadas. Ascos globosos, de paredes grossas, medindo 16-22 x 12-21 μ contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais e frequentemente de septos longitudinais ou mais ou menos obliquos em algumas ou todas as suas células, ligeiramente constritos no septo mediano, medindo 10-16 x 4-7 μ.

Em meio de cultura de batata-dextrose-agar, o fungo forma um talo de crescimento lento, compacto, convoluto, côr de canela *(cinnamon buff)*, coberto de penugem branca de altura irregular, provido de uma zona marginal viscosa.

Maculis in foliis irregularibus, elevatis, verruciformibus, rugosulis, bene definitis, plus minusve sparsis, plerumque epiphyllis, in nervo medio parvis, numerosis, paulo elevatis, rugosis; ascomatibus desuper visis generaliter rotundis, fuscis, erumpentibus, 45-80 μ in diam., in sectione transversa pulvinatis vel hemisphaericalibus, epithecio fusco, 2-4 μ crasso; ascis globosis vel obpyriformibus, numerosis, in 2-3 seriebus confertis, 16-22 x *12-21 μ; ascosporis hyalinis, 3-septatis, loculis nonnullis vel omnibus saepe oblique septatis, ad septum medium leniter constrictis, 10-16* x *4-7 μ.*

Sobre folhas e galhos, causando uma verrugose de *Achras sapota* L. (Sapotaceas), Santos, Estado de São Paulo, Brasil, 15 de Março de 1938. H. S. LEPAGE (tipo). Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 2904 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington D. C. n.º 73141 e Rio de Janeiro, Brasil, Julho de 1939, H. S. LEPAGE. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3307 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington D. C. n.º 73152.

6. *Elsinoë cryptostegiae* n. sp.

Estampa 6

Manchas dos frutos, mais ou menos irregulares, espalhadas ou mais usualmente coalescentes em areas mais ou menos extensas de côr branco-acinzentada *(pallid smoke gray)*, medindo 0,3 a 2 mm. de diametro.

Ascomas vistos na superficie das manchas como numerosos pequenos corpos salientes, esparsos, de côr marron-escura, em secção transversal errumpentes por ruptura da epiderme, formando um estroma pulvinado, feito de um pseudoparenquima homogeneo, hialino na parte mais profunda, escurecendo progressivamente na parte superior ou externa que constitue um epitecio mais ou menos bem definido, medindo 60 a 150 μ de diametro e 45 a 60 μ de espessura. Ascos imersos no pseudoparenquima, irregularmente distribuidos, globosos, com paredes grossas, medindo 18-24 x 16-17 μ contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais e ocasionalmente de um septo longitudinal na célula mediana superior, ligeiramente constritos no septo mediano, retos ou ligeiramente recurvados, medindo 12-16 x 4-6 μ.

Maculis in fructibus plus minusve irregularibus, conspersis vel saepius in areas extentas coalescentibus, pallide fumoso-griseo, 0,3-2 mm. in diam.; ascomatibus parvis, elevatis, fuscis, epidermidem rumpentibus et stroma pulvinatum, in interiore hyalinum, superficiem versus fuscescentem formantibus, 60-150 μ in diam., 45-60 μ crassis, epithecio plus minusve definito; ascis globosis vel obpyriformibus, 18-24 x *16-17 μ; ascosporis transverse 3-septatis, aliquando loculo superiore medio longitudinaliter septato, 12-16* x *4-6 μ.*

Sobre frutos, causando uma antracnose de *Cryptostegia grandiflora* (ROXB.) B. & BR. (Asclepiadaceas), Jardim Botanico, Rio de Janeiro, Brasil, 15 de Outubro de 1938. A. A. BITANCOURT 699. Herba-

rio da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3026 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73481.

7. *Elsinoë costai* n. sp.

Estampa 7, *B* e 8, *A* a *D*

Manchas das folhas, arredondadas, muito salientes, quasi hemisféricas, quasi sempre hipófilas, ocasionalmente epífilas mas não visiveis ou apenas visiveis como uma área deprimida na outra face da folha, mas ou menos esparsas, com superficie irregular rugosa, de côr de avelã *(avellanous)* até pardo-avermelhada *(vinaceous buff)*, medindo 0,5 a 1,8 mm. de diametro, mais alongadas quando situadas no pecíolo ou nos galhos, onde medem 0,5 x 1-2,5 mm.

Ascomas visiveis na superficie das lesões como corpos salientes, indefinidos, de tamanho variavel, de côr amarela muito clara, quasi pulverulentos, ocupando ás vezes a totalidade da superficie das manchas; vistos em secção transversal, mostram-se espalhados nos tecidos da lesão, formando massas de pseudoparenquima homogeneo, hialino ou amarelado, mais ou menos esféricas ou irregulares, frequentemente coalescentes em uma grande massa de tecido que ocupa a maior parte da lesão e simplesmente separadas umas das outras por laminas de grande células necrosadas do parenquima corticoso da lesão, do hospedeiro, de cujos tecidos não se diferenciam nitidamente, sem limites definidos e sem epitecio diferenciado, salvo por uma coloração ligeiramente mais escura na zona periférica. Ascos distribuidos irregularmente no estroma pseudoparenquimatico, localisados principalmente nas porções externas, numerosos, globosos ou ligeiramente ovalados, com paredes espessas, medindo 24-44 x 23-36 μ contendo geralmente 8 ascosporos hialinos, com 3 septos, ocasionalmente com 4 septos, com septo longitudinal em uma ou mais de suas células, constritos no septo mediano, medindo 21-25 x 11-12 μ.

Maculis in foliis rotundis, elevatis, verruciformibus, fere hemisphaericalibus, hypophyllis, interdum epiphyllis, in pagina inferiore aream depressam formantibus, plus minusve conspersis, avellaneis vel vinaceo-alutaceis, 0,5-1,8 mm. in diam., in pedicellis vel caulibus elongatis; ascomatibus immersis, magnitudine variis, interdum superficiem totam gallae occupantibus, flavidis, in textu gallae conspersis, massas sphaericas vel irregulares, definitas vel plus minusve coalescentes formantibus; ascis in stromate irregulariter distributis, vel in parte exteriori locatis, globosis vel obpyriformibus, 24-44 x *23-36* μ; *ascosporis hyalinis, transverse 3-4-septatis, loculis singulis vel pluribus longitudinaliter septatis, 21-25* x *11-12* μ.

Sobre folhas, pecíolos e galhos, causando uma verrugose de *Cordia sellowiana* CHAM. (Borraginaceas), Itatiba, Estado de São Paulo, Brasil, 20 de Setembro de 1936. A. S. COSTA. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2295 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 72797.

Esta especie difere de *Elsinoë mayaguensis* BITANCOURT e JENKINS (ined.)[3] pela estrutura dos ascomas e pelos ascosporos, que são bem maiores.

8. *Elsinoë arrudai* n. sp.

Estampa 9

Manchas das folhas, numerosas, arredondadas ou irregulares, salientes, anfígenas e frequentemente visiveis em ambos os lados das folhas, sendo então frequentemente reduzidas a uma fina membrana pergaminhosa e translúcida, ou mesmo perfuradas, de côr pardo-clara *(pinkish buff)*, esparsas, medindo 0,4 a 2 mm. de diametro, ou coalescentes, especialmente quando desenvolvidas acima das nervuras, onde são maiores e muito alongadas, causando uma distorsão das folhas novas. Nas hastes as manchas podem ser numerosas, grandes, alongadas, medindo 0,5 a 3 por 1 a 10 mm. não raro maiores ainda nas hastes grossas.

Ascomas muito pequenos, com estrutura reduzida, quasi globosos ou ligeiramente achatados, feitos de um pseudoparenquima hialino, cobertos por uma camada externa de pequenas células escuras, formando um epitecio rudimentar, medindo 34-60 x 25-30 µ. Ascos geralmente em pequeno numero, enchendo porem praticamente todo o reduzido ascoma, globosos, com paredes espessas, medindo 21-24 x 19-24 µ, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos quando maduros, ligeiramente constritos no septo mediano, medindo 11-13 x 5 µ.

Em meio de cultura de batata-dextrose-agar o fungo isolado do especimen tipo forma um talo de crescimento lento, compacto, convoluto, saliente, côr de azeitona *(tawny olive)* coberto de uma fina penugem cinzenta e com zona marginal húmida. Uma cultura isolada de outro especimen (N.º 2777) tinha os mesmos caracteres mas era convoluta somente na parte central, formando na periferia uma zona marginal larga, sulcada radialmente. O talo apresentava uma pigmentação avermelhada *(russet vinaceous)* superposta à coloração cinzento-escura.

Maculis in foliis numerosis, rotundis vel irregularibus, saepe amphigenis, saepe membranam papyraceam pellucidam formantibus vel perforatis, roseo-alutaceis, conspersis, 0,4-2 mm. in diam., praecipue per nervos coalescentibus, elongatis, et laminam folii distorquentibus, in caulibus numerosis, magnis, elongatis, 0,5-3 x *1-10 mm.; ascomatibus minutis, e structura reducta compositis, subglobosis vel leniter depressis, parietibus exterioribus paulo obscuris, 34-60* x *25-30* µ*; ascis singulis vel paucis, 21-24* x *19-24* µ*; ascosporis hyalinis, 3-septatis, ad septum medium leniter constrictis, 11-13* x *5* µ.

Sobre folhas, peciolos e hastes, causando uma verrugose de *Tournefortia* sp. (Borraginaceas), Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil, 28 de Fevereiro de 1938. S. C. ARRUDA (tipo). Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2894 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73146. *Tournefortia paniculata* CHAM. Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, 17 de Dezembro de

(3) A. E. Jenkins & A. A. Bitancourt. New Discoveries of Myriangiales in the Americas. Proc. 8th Am. Sci. Cong. Washington, D. C. May 10-21, 1940. Vol. 3. No prelo.

1936. A. A. BITANCOURT 444. Herbario da Secção de Fitopatologia n.º 2350 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73140. *Tournefortia breviflora* D. C., Tieté, Estado de São Paulo, Brasil, 31 de Outubro de 1937. M. KRAMER. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2777 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73144.

9. *Elsinoë verbenae* n. sp.

Estampa 10

Manchas das hastes, numerosas, arredondadas ou irregulares, frequentemente confluentes e cobrindo extensas áreas, com parte central seca, branco-acinzentada *(pallid mouse gray)* em consequencia do esvasiamento das células epidérmicas, fendilhada e irregularmente levantada, e linha marginal marron-escura *(seal brown)*, quasi preta, medindo 0,4 a 5 mm. de diametro.

Ascomas vistos na superficie das lesões como corpos pretos pequeninos, numerosos, esparsos, salientes, um tanto luzidios, em secção transversal pulvinados, ou com parte superior plana, a principio cobertos com as paredes externas das células epidérmicas, em seguida errumpentes, assentados sobre uma camada de prosenquima hialino e feitos de uma parte central pseudoparenquimatica, coberta de uma camada externa de células escuras formando um epitecio, ocasionalmente reduzidos a uma pequena massa esférica de pseudoparenquima, contendo um reduzido numero de ascos, medindo 50-140 x 40-50 μ. Ascos globosos, de paredes espessas, medindo aproximadamente 16 μ de diametro e contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, ás vezes com um septo longitudinal em uma das células superiores que são mais grossas e curtas que as inferiores, muito constritos no septo mediano, um pouco menos nos septos superior e inferior, medindo 15-16 x 5-7 μ.

Maculis in caulibus numerosis, rotundis vel irregularibus, saepe confluentibus et extentis, leniter elevatis et interdum fissis, griseo-albis, margine nigro-brunneo; ascomatibus minutis, fuscis, levibus, conspersis, elevatis, pulvinatis, ex epidermide disrupta erumpentibus, 50-140 x *40-50* μ*; ascis globosis, 16* μ *in diam.; ascosporis hyalinis, 3-septatis, loculis superioribus majoribus quam inferioribus, interdum loculo superiore uno longitudinaliter septato, ad septum medium constrictis, 15-16* x *5-7* μ.

Sobre hastes e inflorescencias, causando uma antracnose de *Verbena bonariensis* L. (Verbenaceas), Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, 12 de Janeiro de 1939. A. P. VIÉGAS e A. S. COSTA. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3167 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73482.

10. *Elsinoë caroli* n. sp.

Estampa 11

Manchas das folhas, redondas ou ligeiramente irregulares, anfígenas, porem mais frequentemente hipófilas, salientes e mesmo verrugosas numa das faces da folha, lisas e deprimidas, ás vezes apenas visiveis, na face oposta, de côr marron mais ou menos escura *(army brown* a *fawn color)* na face saliente, marron escura avermelhada *(seal brown)* na face lisa, medindo 0,3 a 1,6 mm. de diametro, alongadas, até 2 mm., nas nervuras. Nos galhos as manchas são pequenas, pouco conspicuas, alongadas, ligeiramente salientes.

Os ascomas não se podem distinguir no exame superficial das manchas e ocupam toda a parte superior das lesões, formando um estroma continuo, pulvinado, constituindo a quasi totalidade dos tecidos das lesões, de estrutura pseudo-parenquimatica homogenea e coloração marron clara, sem camada externa diferenciada em epitecio. Ascos numerosos, irregularmente distribuidos em varias camadas, principalmente localisadas na parte superior do estroma, globosos, de paredes espessas, medindo 26-34 x 20-24 μ e contendo de 2 a 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 a 6 septos transversais, com septos longitudinais ou mais ou menos obliquos em algumas de suas células, medindo 18-20 x 7-9 μ.

Maculis in foliis rotundis vel paulo irregularibus, amphigenis, saepius hypophyllis, in una pagina elevatis et verrucosulis, in altera levibus et vix evidentibus, brunneis, 0,3-1,6 mm. in diam., in nervis elongatis, 2 mm.; ascomatibus stroma continuum superficialem formantibus, brunneis, epithecio nullo; ascis numerosis, in seriebus pluribus, praecipue in parte superiore stromatis, irregulariter distributis, globosis, obpyriformibus vel ellipsoideis, 26-34 x *20-24* μ; *ascosporis hyalinis, transverse 3-6-septatis, et longitudinaliter vel oblique septatis, ad septum medium constrictis 18-20* x *7-9* μ.

Sobre folhas, peciolos, gavinhas e galhos, causando uma verrugose de uma Dicotiledonea voluvel silvestre (Bignoniaceas?). Nova Represa, Estado de São Paulo, Brasil, 21 de Fevereiro de 1937. CARLOS L. BITANCOURT e KARL SILBERSCHMIDT. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2428 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73143.

O mesmo fungo ou uma especie visinha se encontra em folhas de uma Bignoniacea, colhidas em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil, em 7 de Abril de 1936 por H. P. KRUG e G. P. VIEGAS. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Agronomico do Estado de São Paulo n.º 1496. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2224 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 72794 (Est. 7, *A* e 8, *E* e *F*).

11. *Elsinoë caleae* n. sp.

Estampa 12

Manchas das folhas, redondas ou ligeiramente irregulares, visiveis em ambas as faces da folha, com 1 a 2 mm. de diametro, com linha marginal de 0,2 a 0,5 mm. de largura, de côr preto-arroxeada *(dull purplish black)* que se torna mais clara *(taupe brown)* do lado externo, com centro de côr pardo-clara *(wood brown* a *vinaceous buff)*, esparsas ou ocasionalmente confluentes; manchas dos peciolos e das hastes menores e ligeiramente alongadas, medindo 0,5 x 0,6-2 mm., numerosas, cobrindo ás vezes áreas extensas, por coalescencia, de côr pardo-clara ligeiramente rosada *(pinkish cinnamon)* com linha marginal escura.

Ascomas visiveis na superficie das lesões como pequenos corpos escuros, arredondados ou oblongos, em secção transversal intraepidérmicos, pulvinados, errumpentes, medindo de 100 a 190 µ de diametro e 30 a 70 µ de espessura, feitos de um pseudoparenquima, hialino na parte central, coberto na parte externa de uma camada de células mais escuras, formando um epitecio. Ascos globosos ou subpiriformes, distribuidos irregularmente no pseudoparenquima, medindo 21-26 x 21-24 µ, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, ás vezes com septos longitudinais numa, ou nas duas células superiores, que são mais curtas e grossas que as inferiores, acentuadamente constritos no septo mediano e ocasionalmente tambem nos dois outros septos transversais, medindo 13-17 x 6-8 µ.

Maculis in foliis rotundis vel paulo irregularibus, amphigenis, fuscis vel pallide vinaceo-alutaceis, margine purpureo-atro, 1-2 mm. in diam., conspersis vel interdum confluentibus, in caulibus petiolisque plus minusve elongatis, 0,5 x *0,6-2 mm. numerosis, coalescentibus, roseo-cinnamomeis, fusco-marginatis; ascomatibus parvis, fuscis, desuper visis rotundis vel oblongis, intraepidermicalibus, pulvinatis, erumpentibus, 100-190* µ *in diam., 30-70* µ *crassis, epithecio praesente; ascis globosis vel leniter obpyriformibus, 21-26* x *21-24* µ*; ascosporis hyalinis, 3-septatis, interdum loculis superioribus singulis vel duobus longitudinaliter septatis, 13-17* x *6-8* µ.

Sobre folhas e hastes, causando uma antracnose de *Calea pinnatifida* Less. (Compostas), Taipas, Estado de São Paulo, Brasil, 29 de Maio de 1939. A. A. Bitancourt 732 (tipo). Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3292 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73151 e Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, 3 de Dezembro de 1937, E. Ract. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2805 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73145.

12. *Elsinoë ractii* n. sp.

Estampa 13

Manchas das folhas, pequenas, medindo 0,5 a 1,5 mm. de diametro, pouco conspicuas, arredondadas ou irregulares, visiveis em ambas as faces da folha, com os tecidos da parte central adelgaçados, translúcidos, semelhantes a perga-

minho, côr de avelã *(avellanous* a *tilleul buff)*, frequentemente mais ou menos dilaceradas, ás vezes distribuidas ao longo das nervuras, hipófilas e alongadas, esparsas ou mais ou menos confluentes, causando uma ligeira distorsão ou rasgamento dos tecidos da folha; manchas dos galhos, maiores que as das folhas, medindo 0,8 a 2 mm., numerosas, bastante salientes, um tanto verrugosas, com superficie aspera, de côr parda mais ou menos escura *(cinnamon drab* a *benzo brown)* frequentemente confluentes e cobrindo áreas mais ou menos extensas do galho.

Ascomas vistos na superficie das lesões como corpos de côr marron, achatados, redondos ou ovalados, medindo até 250 µ de comprimento, mostrando-se em secção transversal assentados sobre uma camada pseudoparenquimatica ou hipostroma hialino, de 10 a 40 µ de espessura, desenvolvidos nas células epidérmicas do hóspede, e formados de um pseudoparenquima hialino, cobertos na parte superior ou externa de uma ou duas camadas de células escuras, constituindo um epitecio, medindo aproximadamente 150 a 250 µ de diametro por 10-40 µ de espessura. Ascos globosos ou piriformes, imersos no pseudoparenquima, de paredes espessa, medindo 15-24 x 14-20 µ e contendo de 2 a 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 a 5 septos transversais, frequentemente tambem de septos longitudinais em uma ou mais de suas células, pronunciadamente constritos nos septos transversais, com a extremidade superior arredondada, a inferior mais ou menos adelgaçada, subaguda, medindo 13-18 x 5-9 µ.

Em meio de cultura de batata-dextrose-agar, o fungo forma um talo de crescimento lento, compacto, convoluto, saliente, quasi umbonado, coberto de penugem côr de canela *(pinkish cinnamon)*, emprestando ao meio de cultura uma leve coloração avermelhada.

Maculis in foliis parvis, 0,5-1,5 mm. in diam., inconspicuis, rotundis vel irregularibus, amphigenis, parte centrali papyracea pellucidaque, pallidis vel avellaneis, saepe plus minusve laceratis, interdum nerviicolis, in nervis majoribus 0,8-2 mm., numerosis, elevatulis, asperatis, sordide cinnamomeis vel brunneis, saepe confluentibus et plus minusve extentis; ascomatibus brunneis, depressis, desuper visis rotundis vel ovalibus, 150-250 µ in diam., 10-40 µ crassis, in cellis epidermicalibus evolventibus, epithecio praesente; ascis globosis vel obpyriformibus, in stromate confertis, 15-24 x *14-20 µ; ascosporis hyalinis, 3-5-septatis, loculis singulis vel pluribus longitudinaliter septatis, ad septum medium constrictis, apice rotundatis et basi plus minusve attenuatis, 13-18* x *5-9 µ.*

Sobre folhas e hastes, causando uma verrugose de *Ambrosia polystachya* D. C. (Compostas), Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, 23 de Março de 1938. E. RACT. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 2902 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73147.

13. *Elsinoë deslandesii* n. sp.

Estampa 14

Manchas das folhas, pequenas, com 0,2 a 1,5 mm. de diametro, redondas, ou, quando situadas nas nervuras, irregulares e mais ou menos confluentes, visiveis em ambas as faces da folha, porem mais conspicuas na face superior, côr de

canela *(pinkish cinnamon)* tornando-se ligeiramente mais claras na parte central, onde os tecidos se acham frequentemente rasgados. Nos peciolos e nos galhos, as manchas são alongadas, medindo 0,5-1 x 1,5-2,5 mm., salientes, com a parte central de superficie lisa, ás vezes deprimida e fendilhada.

Ascomas vistos na superficie das lesões como numerosos corpos pequeninos, de côr marron, geralmente arredondados, salientes, quasi brilhantes, em secção transversal intraepidérmicos, salientes, pulvinados, errumpentes, quasi hemisféricos, com a parte interna pseudoparenquimática, hialina, coberta externamente de uma camada escura de células ou epitecio, medindo de 40 a 100 µ de diametro. Ascos globosos ou piriformes, de paredes espessas, com 16-25 x 18-24 µ, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais, com septo longitudinal em uma ou duas das tres células superiores, bem contritos no septo mediano, com as duas células superiores mais curtas e grossas que as inferiores, medindo 14-17 x 5-7 µ.

Maculis in foliis parvis, 0,2-1,5 mm. in diam., rotundis vel in nervis irregularibus vel plus minusve confluentibus, amphigenis, epiphyllis conspicuoribus, roseo-cinnamomeis, medio pallidioribus et laceratis, in pedicellis et nervis elongatis, 0,5-1 x *1,5-2,5 mm., parte centrali levi, interdum depressa et fusca; ascomatibus numerosis, fuscis, nitentibus, desuper visis generaliter rotundis, elevatis, intraepidermicalibus, pulvinatis, erumpentibus, in sectione transversa fere hemisphaericalibus, 40-100* µ *in diam., ascosporis globosis vel obpyriformibus, 3-septatis, loculis superioribus singulis vel duobus longitudinaliter septatis, ad septum medium plerumque constrictis, 14-17* x *5-7* µ.

Sobre folhas e galhos, causando uma antracnose de *Moquinia polymorpha* (LESS.) D. C. (Compostas), Iguassú, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 9 de Março de 1939. J. DESLANDES, 727. Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo n.º 3238 e coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C. n.º 73150.

*

* *

Com as treze especies que acabam de ser descritas, existem hoje 35 especies de *Elsinoë* descritas na forma perfeita. As novas especies, juntamente com as que já eram conhecidas anteriormente, foram empregadas em 1939 (2) para ilustrar os caracteres do genero *Elsinoë* RAC. (7) conforme ele é hoje conhecido. Elas foram igualmente utilisadas numa recente revisão da descrição do genero (6).

Deve-se notar que *Elsinoë costai* (Est. 7,*B* e 8,*A* a *D*) e *E. caroli* (Est. 7,8 e 11) parecem-se com a especie tipo de *Elsinoë* RAC., ou seja *E. canavaliae* RAC. (6), pelo fato de não possuirem um epitecio escuro, e, no caso de *E. costai*, pelo fato de confundir-se, praticamente, pela côr, o pseudoparenquima claro em que se acham imersos os ascos, com os tecidos claros da galha formada pelos tecidos do hospedeiro. *E. ro-*

chalimai é um caso tipicamente oposto ás duas especies que acabam de ser citadas, pois nela as lesões são tornadas bem visiveis justamente pela presença de um revestimento epitecial escuro sobre os numerosos ascomas errumpentes, densamente agregados (Est. 4). Ainda deve ser notado que os ascomas em *E. arrudai* são muito reduzidos, ás vezes com pouco estroma e poucos ascos, á semelhança de *E. menispermacearum* RAC. (Est. 9).

As fotomicrografias das estampas do presente trabalho mostram que pode haver uma grande variação no tamanho dos ascos e dos ascosporos das diversas especies do grupo. *Elsinoë blechni* (Est. 1, *F*, *a*) por exemplo, assim como outras especies, têm ascos pequenos, em comparação com os de *E. caroli* (Est. 11, *D* e *F*). RACIBORSKI (7) descreveu o estroma homogeneo, de coloração clara, em que se acham imersos os ascos, como localisado debaixo da epiderme que acaba rompendo. ARNAUD (1) mostrou que o proprio epiderma é penetrado e finalmente rompido, o que se acha tambem ilustrado em varias especies descritas no presente trabalho. Com poucas exceções, um epitecio escuro, mais ou menos bem desenvolvido, se acha presente, conforme se acha ilustrado.

ISOLAMENTOS E COMPARAÇÕES CULTURAIS

As culturas das 5 especies citadas na introdução foram isoladas das seguintes maneiras: *Elsinoë lepagei* sobre *Achras sapota*, a partir de um único ascosporo (cultura 243 D [4]); *E. arrudai* do estagio imperfeito em lesões de *Tournefortia breviflora* (cultura 105D) e de um único ascosporo obtido de ascomas em lesões de *Tournefortia* sp. (cultura 218D); *E. ractii* sobre *Ambrosia polystachya* (cultura 238D) e *E. boehmeriae* sobre *Boehmeria caudata* (cultura 430D) ambas a partir de um único ascosporo; *E. verbenae* sobre *Verbena bonariensis* (cultura 412D) a partir de dois ascosporos e *E. caroli* sobre uma Dicotiledonea (cultura 481C) das lesões existentes no especimen n.º 2224 do herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico. Esta ultima cultura foi isolada por H. P. KRUG, que cedeu uma repicagem aos autores.

Duas series culturais comparativas em meio de batata-dextrose-agar foram feitas com essas culturas. Uma dessas series, feita em Washington, em meio "A", em tubos de cultura, incluio *E. boehmeriae*, *E. lepagei*, *E. arrudai*, *E. verbenae* e *E. ractii*, tendo sido tambem incluidas culturas de *E. theae* BITANCOURT & JENKINS (3), *E. randii* JENKINS & BITANCOURT (5) e *E. anonae* BITANCOURT & JENKINS (ined.)[5] isolada de *Anona squamosa* e *Anona cherimolia* (Estampa 15).

(4) O numero das culturas é o da coleção da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo.
(5) Descrita no trabalho citado na nota 3, p. 8.

A outra serie[6] foi feita em São Paulo, em meios "B" e "C", tanto em tubos de cultura como em caixas de Petri. As culturas foram feitas em principio de 1939 e desenvolveram-se, algumas à temperatura do laboratorio e outras a 32°C. A serie incluio *E. lepagei*, *E. arrudai*, *E. ractii* e *E. theae* (Estampa 16 e 17).

As fórmulas para os meios "A", "B" e "C", de batata-dextrose-agar apresentam ligeiras diferenças entre si e foram dadas num trabalho anteriormente citado (4, p. 55)[7]. O meio "A" é habitualmente usado pelo segundo autor em trabalhos de cultura em Washington, D. C., Estados Unidos, ao passo que os meios "B" e "C" são usados pelo primeiro autor, em São Paulo. O desenvolvimento em tubos de cultura, no meio "B", foi brevemente descrito nas descrições técnicas das especies correspondentes.

Todas as quatro especies da segunda serie comparativa desenvolveram-se bem à temperatura do laboratorio e a 32°C desenvolveram-se um pouco, porem acentuadamente menos.

THIRTEEN NEW SPECIES OF "ELSINOË" FROM BRAZIL

Abstract

Technical descriptions are given of thirteen new species of Elsinoë from Brazil, discovered there between 1936 and 1939. One is from the city of Rio de Janeiro, two from the State of Rio de Janeiro, and the others from the State of São Paulo. The thirteen new species, their hosts and host families are listed as follow:

(1) *Elsinoë blechni on Blechnum serrulatum (Polypodiaceae);* (2) *E. boehmeriae on Boehmeria caudata (Urticaceae);* (3) *E. kramerii on a species of Leguminosae;* (4) *E. rochalimai on an undetermined Dicotyledon;* (5) *E. lepagei on Achras sapota (Sapotaceae);* (6) *E. cryptostegiae on Cryptostegia grandiflora (Asclepiadaceae);* (7) *E. costai on Cordia sellowiana (Borraginaceae);* (8) *E. arrudai on Tournefortia sp., T. paniculata and T. breviflora (Borraginaceae);* (9) *E. verbenae on Verbena bonariensis (Verbenaceae);* (10) *E. caroli on a species of Bignoniaceae;* (11) *E. caleae on Calea pinnatifida (Compositae);* (12) *E. ractii on Ambrosia polystachya (Compositae);* (13) *E. deslandesii on Moquinia polymorpha (Compositae).*

Among these species Elsinoë costai and E. caroli resemble E. canavaliae, the generic type of Elsinoë in that,

(6) Comparação cultural n.º 39, Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo.

(7) Nesse trabalho a quantidade de batata empregada no meio "A" foi dada como sendo 250 grs. quando na realidade é de 500 grs.

as studied, they consist only of a more or less homogeneous pseudoparenchyma and have no dark epithecium. In most of the other species an epithecium is more or less well developed and is conspicuous in E. rochalimai rendering the lesion dark colored.

Isolations were made from a single ascospore of each Elsinoë boehmeriae, E. lepagei, E. arrudai, E. ractii, from two ascospores of E. verbenae as well as from the imperfect stage of E. arrudai and E. caroli.

Grown in parallel cultures the four species, E. lepagei arrudai, E. ractii, and E. theae grew well at room temperature; at 32°C their development was greatly retarded.

BIBLIOGRAFIA

1 — ARNAUD, G. — 1925 — Les Asterinées. IV partie. (Études sur la systematique des champignons pyrénomycetes) *Ann. Sci. Nat. Bot.* 7: 643-722.

2 — BITANCOURT, A. A. — 1940 — Variations in fructifications of *Elsinoë*, including descriptions of new species. Report of Proceedings. *Third International Congress for Microbiology.* New York, September 2-9, 1939, pp. 512-513.

3 — BITANCOURT, A. A. and JENKINS, A. E. — 1939 — *Elsinoë theae* n. sp., agente da verrugose do chá. *Arq. Inst. Biol.* (São Paulo) **10**: 294-298.

4 — BITANCOURT, A. A. and JENKINS, A. E. — 1940 — Novas especies de *Elsinoë* e *Sphaceloma* sobre hospedes de importancia economica. *Arq. Inst. Biol.* (São Paulo) **11**: 45-58.

5 — JENKINS, A. E. and BITANCOURT, A. A. — 1938 — An Elsinoë causing an Anthracnose on Hicoria pecan. *Phytopathology.* **28**: 75-78.

6 — JENKINS, A. E. and BITANCOURT, A. A. — 1941 — Revised description of the genera *Elsinoë* and *Sphaceloma. Mycologia.* **33**: 338-340.

7 — RACIBORSKI, M. — 1900 — Parasitische Algen und Pilze Javas. *t.* 1 (30 p.) und 2 (46 p.) Batavia.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Elsinoë blechni causando uma antracnose em fronde de *Blechnum serrulatum,* São Vicente, Estado de São Paulo, 11 de Abril de 1936, A. E. JENKINS. *A*, face superior de parte de uma fronde, x 1. *B*, parte superior de um foliolo com 3 lesões, vendo-se os ascomas em *a*, x 5. *C*, *D* e *E*, ascomas intraepidérmicos, *a*, parede superior da epiderme rompida, *b*, tecidos subjacentes do hospedeiro, *C,c*, epitecio, *C,d*, *D,c* e *E,c*, ascos. *F*, ascos (*a*) e ascosporos (*b*), coloridos por azul algodão C4B. *C* a *F*, x 500.

Fot. M. L. F. FOUBERT (A) e BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 2

Elsinoë boehmeriae causando pequenas lesões de antracnose em folhas de *Boehmeria caudata*, Tieté, Estado de São Paulo, 8 de Fevereiro de 1939, A. S. COSTA. *A*, face superior de uma folha. *B*, face inferior, x 1. *C*, area *A,a*, aumen-

tada 5 vezes. *D*, area *B,a*, aumentada 5 vezes, *a*, lesões. *E*, secção transversal de um ascoma; *a*, epitecio, *b*, ascos, *c*, ascosporos, *d*, tecidos subjacentes do hospedeiro. *F*, ascos (*a*) e ascosporos (*b*). *E* e *F*, x 500.

Foto. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 3

Elsinoë kramerii causando uma verrugose sobre folhas e hastes de uma Leguminosa nativa (Papilionadas), São Gonçalo, Estado do Rio de Janeiro, 16 de Outubro de 1938, M. KRAMER. *A*, face inferior de uma folha. *B*, face superior. *C*, haste. Tudo x 1. *D* e *E*, areas de *A* e *B* respectivamente, aumentadas 5 vezes, *D,a*, lesão numa nervura, *E,a*, ascomas, indistintamente visiveis. *F*, ascoma, *a*, epiderme rompida, *b*, epitecio, *c*, grupos de ascos, indistintamente visiveis, *d*, ascosporo bicelular. *G*, ascos (*a*) e ascosporos (*b*) ligeiramente coloridos por azul algodão C4B. *F* e *G*, x 500.

Fot. M. L. F. FOUBERT (C) e BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 4

Elsinoë rochalimai causando uma verrugose sobre uma Dicotiledonea nativa (? Dileniaceas), Eldorado, Nova Represa, São Paulo, Estado de São Paulo, 21 de Fevereiro de 1937, A. A. BITANCOURT. *A*, face inferior de uma folha, x 1. *B*, 4 lesões que se vêem em *A,a*, mostrando os numerosos ascomas erumpentes, densamente agregados. com revestimento epitecial escuro, x 5. *C*, parte de um ascoma, *a*, epitecio, *b*, ascos indistintamente visiveis, *c*, tecidos subjacentes do hospedeiro. *D*, ascos contendo ascosporos (*a*) e ascosporos (*b*) coloridos por azul algodão C4B. *C* e *D*, x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 5

Elsinoë lepagei sobre folhas de *Achras sapota*, Santos, Estado de São Paulo, 15 de Março de 1938, H. S. LEPAGE. *A*, lesões esparsas na face superior, menos conspicuas na face inferior (*B*), *B,a*, lesão sobre a nervura principal. x 1. *C*, detalhe da região apical da folha maior, em *A*, mostrando lesões salientes, x 5. *D*, forma imperfeita na superficie da folha, *a*, epiderme rompida, *b*, o fungo, *c*, tecidos subjacentes do hospedeiro. *E* e *F*, secções transversais de um ascoma, *a*, epitecio, *b*, ascos contendo ascosporos, *c*, tecidos do hospedeiro. *G*, maceração de um ascoma mostrando ascosporos (*a*) e ascos (*b*) no meio do estroma. *E*, *F* e *G*, ligeiramente colorido por azul algodão C4B, *D* a *F*, x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 6

Elsinoë cryptostegiae causando uma antracnose de *Cryptostegia grandiflora*, Jardim Botanico, Rio de Janeiro, 15 de Outubro de 1939, A. A. BITANCOURT. *A*, sobre frutas, x 1. *B*, parte do fruto á esquerda de *A*, aumentado 5 vezes. *C* e *D*, ascomas sob a epiderme rompida (*a*), *b*, epitecio, *c*, tecidos subjacentes do hospedeiro, *d*, asco. *E*, maceração de um ascoma, mostrando ascos (*a*) contendo ascosporos, e ascosporos livres (*b*) ligeiramente coloridos com azul algodão C4B, *C* a *E*, x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 7

A, Elsinoë sp., possivelmente *E. caroli,* causando lesões de verrugose na face inferior de folhas de uma Bignoniacea, Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, 6 de Abril de 1936, H. P. Krug e G. P. Viegas, x 1. *B, Elsinoë costai* causando uma verrugose saliente na face inferior de uma folha de *Cordia sellowiana,* Itatiba, Estado de São Paulo, 20 de Setembro de 1938, A. S. Costa, x 1.

Fot. Bitancourt & Rodrigues

Estampa 8

A a *D, Elsinoë costai, A,* Detalhe da figura *B,* estampa 7, mostrando diversas lesões, aumentado 5 vezes. *B,* Secção transversal de uma galha de folha mostrando o tecido hiperplástico da planta hospedeira em que se acham imersos diversos ascomas (*a*), *b-c,* espessura normal da folha, x 100. *C,* Maceração de ascoma mostrando ascos contendo ascosporos (*a*) e ascosporos livres (*b*). *D,* região externa de um ascoma, mostrando os ascos (*a*), x 500. *E* e *F. Elsinoë* sp. da estampa 7, *A. E,* Secção transversal de uma folha na região de uma lesão, *a,* ascoma com numerosos ascos, x 100. *F,* Detalhe do ascoma, mostrando os ascos contendo ascosporos (*a*), x 500. *B* a *F,* ligeiramente coloridos por azul algodão C4B.

Fot. Bitancourt & Rodrigues

Estampa 9

Elsinoë arrudai causando uma verrugose em folhas, peciolos e hastes de *Tournefortia* sp., Piracicaba, Estado de São Paulo, 28 de Fevereiro de 1938, S. C. Arruda. *A,* face superior de uma folha, x 1. *B,* haste, x 1. *C,* detalhe de *A,* aumentado 5 vezes. *D,* lesões da nervura principal, face inferior, x 5. *E,* Asco com ascosporos *(a)* e ascosporos livres *(b)*, coloridos com azul algodão C4B, x 500. *F* a *H,* pequenos ascomas na parte externa dos tecidos do hospedeiro (*b*), *F,a* e *H,a,* ascomas, *G,c,* asco indistintamente visivel, *H,c,* epiderme rompida, x 500.

Fot. Bitancourt & Rodrigues

Estampa 10

Elsinoë verbenae causando uma antracnose das hastes e inflorescencias de *Verbena bonariensis,* Campinas, Estado de São Paulo, 12 de Janeiro de 1939, A. P. Viegas e A. S. Costa. *A,* x 1. *B,* Detalhes das hastes de *A,* aumentados 5 vezes. *C,* Ascoma pequeno imerso nos tecidos do hospedeiro, *a,* parede externa da epiderme, *b,* estroma escuro da frutificação, *c,* ascos, x 500. *D,* Ascoma bem desenvolvido, *a,* parede externa da epiderme rompida, *b,* epitecio, *c,* ascos, *d,* estroma, *e,* tecidos subjacentes do hospedeiro, x 500. *E,* Maceração de ascoma mostrando os ascospores expelidos de seus ascos, ligeiramente coloridos por azul algodão C4B, x 500.

Fot. Bitancourt & Rodrigues

Estampa 11

Elsinoë caroli causando uma verrugose de uma Dicotiledonea (Bignoniaceas) Nova Represa, São Paulo, Estado de São Paulo, 21 de Fevereiro de 1937, Carlos L. Bitancourt e K. Silberschmidt. *A,* folhas e hastes atacadas, á esquerda face superior, á direita face inferior. *B* e *C,* detalhes da face superior (*B*) e inferior (*C*) de uma folha, aumentados 5 vezes. *D,* lesão da face superior de uma folha mostrando um ascoma com numerosos ascos (*a*), *b,* tecido hiperplás-

tico da folha na região do parenquima paliçadico, x 100. *E*, Ascosporos, x 500. *F*, Detalhe da região externa do ascoma, mostrando ascos e ascosporos, x 500. *D* a *F*, colorido por azul algodão C4B.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 12

Elsinoë caleae causando uma antracnose de *Calea pinnatifida*, Taipas, Estado de São Paulo, 28 de Março de 1938, A. A. BITANCOURT. *A*, Hastes e folhas com lesões, x 1. *B*, Detalhe de *A*,*a*, aumentado 5 vezes. *C*, Pequeno ascoma ainda sob a parede externa da epiderme (*a*) vendo-se os lóculos vasios de dois ascos (*b*), *c*, tecido do hospedeiro sob o ascoma, *d*, epitecio, x 500. *D*, Maceração de ascoma vendo-se ascos cheios de ascosporos (*a*) e ascosporos livres (*b*), ligeiramente coloridos por azul algodão C4B, x 500. *E*, Ascoma errumpente, bem desenvolvido, na superficie de uma folha, *a*, epitecio, *b*, asco, *c*, tecido estromatico, *d*, tecidos da folha, x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 13

Elsinoë ractii causando uma verrugose de folhas de *Ambrosia polystachya*, Cantareira, Estado de São Paulo, 23 de Março de 1938, E. RACT. *A*, Parte de uma folha mostrando lesões inconspicuas, x 1. *B*, Detalhe de uma folha, aumentado 5 vezes. *C*, Verso da mesma folha representada em *B*, vendo-se lesões menos distintas, algumas sobre a nervura (*a*). *D*, Ascoma, *a*, epitecio, *b*, ascos agrupados, *c*, estroma, *d*, tecidos subjacentes do hospedeiro, x 500. *E*, Maceração de ascoma mostrando ascosporos livres (*a*) e outros em grupos dentro do asco rompido (*b*), ligeiramente coloridos por azul algodão C4B, x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 14

Elsinoë deslandesii causando uma antracnose de *Moquinia polymorpha* Iguassú, Estado do Rio de Janeiro, 9 de Março de 1939, J. DESLANDES. *A*, Hastes e folha atacadas. *B*, Detalhe de uma haste, x 5. *C*, Detalhe de uma folha, x 5. *D*, Ascoma saliente, *a*, epitecio, *b*, asco, *c*, tecidos do hospedeiro, x 500. *E*, Maceração de ascoma vendo-se ascos vasios (*a*) e ascosporos expelidos dos mesmos (*b*), x 500.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

Estampa 15

Culturas desenvolvidas em Washington, D.C., Estados Unidos, em meio de batata-dextrose-agar (meio "A"), preparado por Miss Agnes Quirk, Division of Fruit and Vegetable Crops and Diseases, Bureau of Plant Industry (comparação cultural n.º 81, de Anna E. Jenkins): *A*, *E. boehmeriae*, monoascospórica (430D). *B*, *E. lepagei*, monoascospórica (243D). *C*, *E. arrudai*, isolado de lesões de *Tournefortia breviflora*, a partir da forma imperfeita, (105D). *D*, *E. arrudai* de *Tournefortia* sp. monoascospórica (218D). *E*, *E. verbenae*, a partir de 2 ascosporos (412D). *F*, *E. ractii*, monoascospórica (238D). *G*, *E. theae*, a partir de lesões velhas (360D). *H*, *E. anonae* Bitancourt & Jenkins (ined.), de *Anona squamosa*, Domingos Vilela, S. Paulo, a zona marginal amarela é viscosa, cultura de tecido de lesões (273D). *I*, *E. anonae* de *Anona cherimolia*, Cantareira, S. Paulo, monoascospórica (737D). *J*, *E. theae*, monoascospórica (306D). *K*, *E. randii* Jenkins & Bitancourt, de *Carya illinoensis*, Campinas, cultura de tecido de lesões (981C)

e *L*, *E. randii*, do mesmo especimen, monoascospórica (980C). As culturas têm aproximadamente um mez de idade, com exceção de 360D *(E. theae)* que tem mais ou menos 25 dias e 306D *(E. theae)*, com aproximadamente 21 dias.

Desenho a cores por J. MARION SHULL.

Estampa 16

Comparação cultural paralela, em meios de batata-dextrose-agar em tubos, representando o desenvolvimento de culturas de 13 de Janeiro a 13 de Fevereiro de 1939. *A* e *B*, Na temperatura ambiente, *C* e *D*, a 32.º C. *A* e *C*, meio "B", e *B* e *D*, meio "C", x 1. Para uma descrição desses meios ligeiramente diferentes entre si, ver o paragrafo relativo ás comparações culturais.

a, *Elsinoë lepagei*, de *Achras sapota*, cultura monoascospórica (243D); *b*, *E. arrudai*, cultura da forma imperfeita, sobre *Tournefortia breviflora*, Tieté, Estado de São Paulo (105D); *c*, *E. arrudai*, cultura monoascosporica de *Tournefortia* sp., Piracicaba (218D); *d*, *E. ractii*, de *Ambrosia polystachya* (238D); *e*,*f* e *g*, culturas de *E. theae*, de *Thea sinensis*, Cantareira, Estado de São Paulo, 1938, *e*, cultura monoascopórica (306D), *f*, cultura obtida de lesões novas (359D), *g*, cultura obtida de lesões velhas (360D). Tudo x 1.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

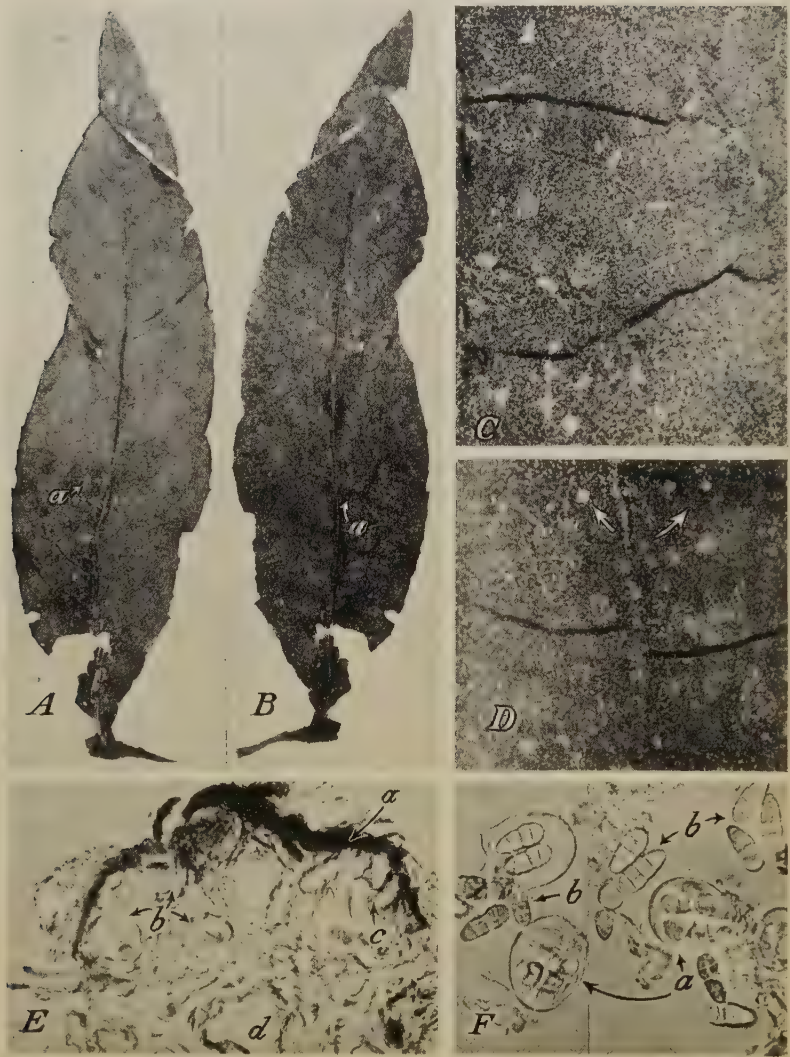
Estampa 17

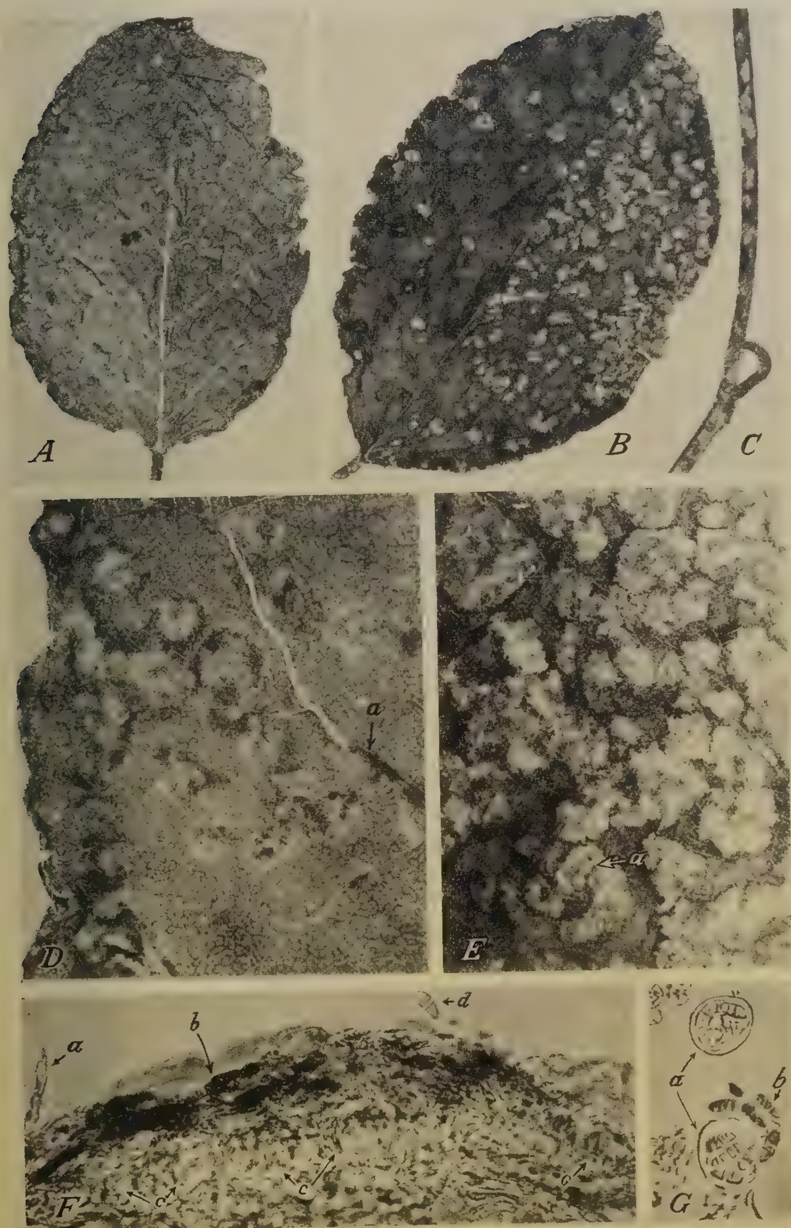
Comparação cultural paralela sobre meio de batata agar em caixas de Petri, representando o desenvolvimento das mesmas culturas da estampa 15, de 13 de Janeiro a 16 de Março de 1939. *A*, *Elsinoë lepagei*. *B*, *E. arrudai* (105D). *C*, *E. arrudai* (218D). *D*, *E. ractii*. *E* a *G*, *E. theae*; *E*, 306D; *F*, 359D; *G*, 360D. *a* e *b*, sobre meio "B"; *c* e *d*, sobre meio "C"; *a* e *c*, á temperatura ambiente; *b* e *d*, a 32ºC. 2/3 tamanho natural.

Fot. BITANCOURT & RODRIGUES

———o———

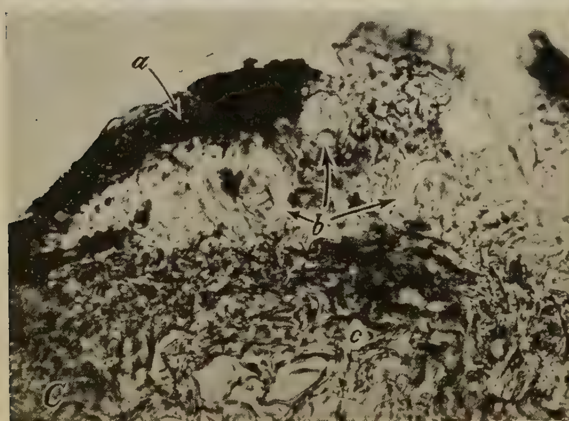

a
a
a
A
B
a
c
d
C
b
a
c
D
b
c
a
E
b
a
b
F

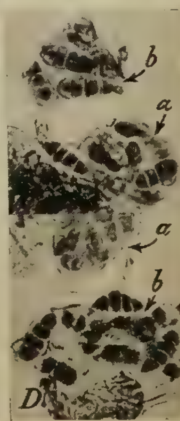

a
a
A
B
C
D
a
b
c
d
E
b
b
b
a
F


A
B
C
D
a
E
a
F
a
b
c
c
c
d
G
a
b


a
A


B


a
b
c
C

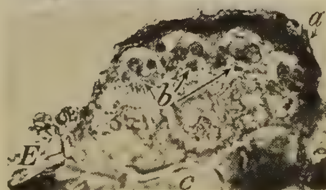

b
a
a
b
D

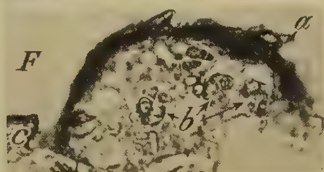

A


a
B

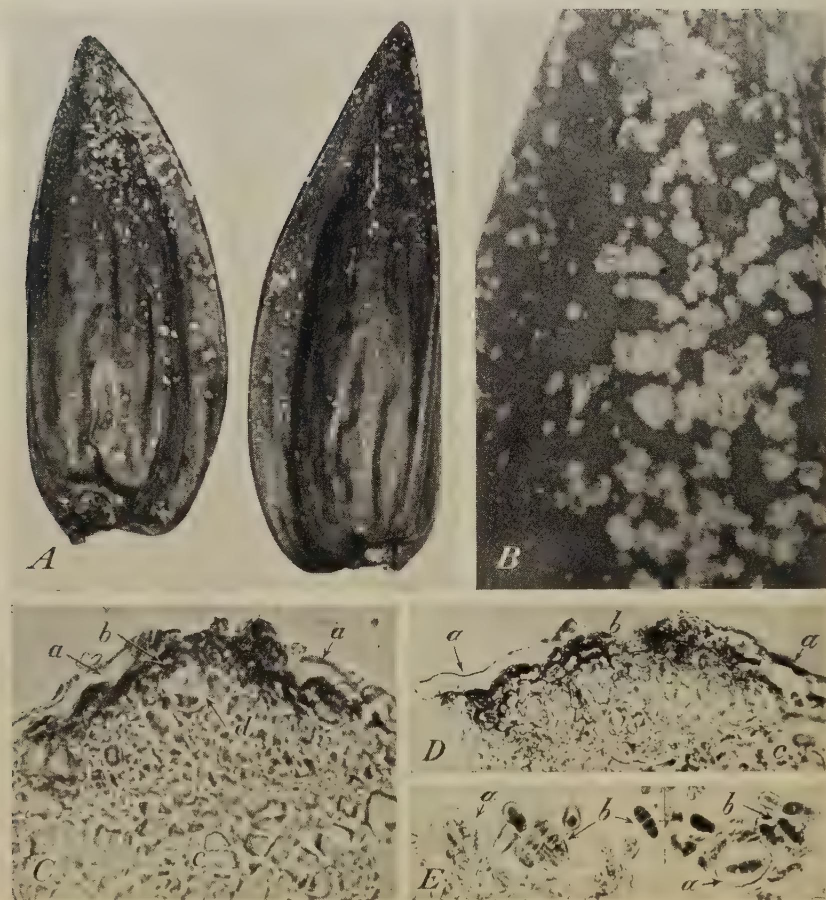

C


a
b
D
c

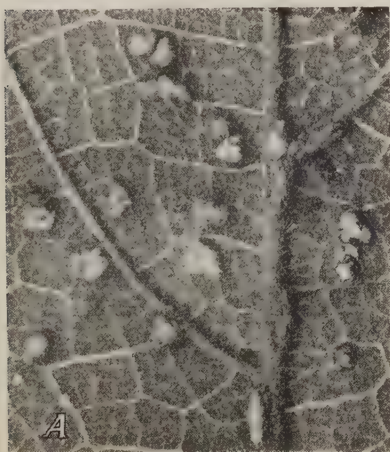

a
b
E
c


F
a
b
c


b
a
G

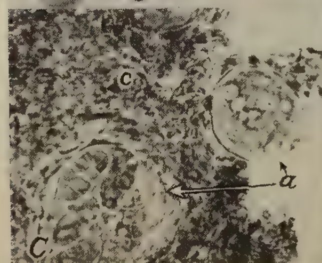

A
B
a
b
a
d
C
c
a
b
a
D
c
a
b
b
E
a

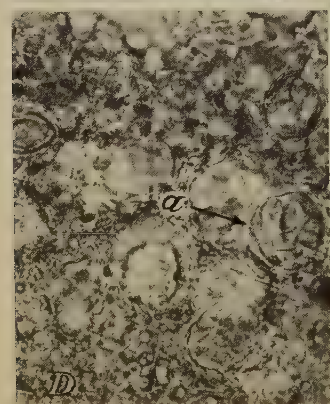

A
A
B

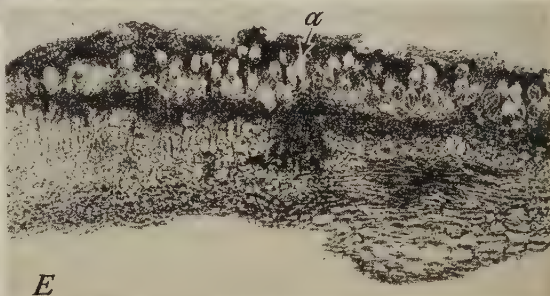

A


a
a
a
a
b
c
B

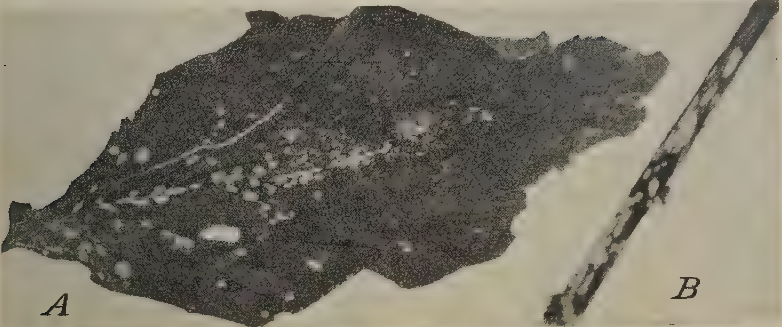

b
a

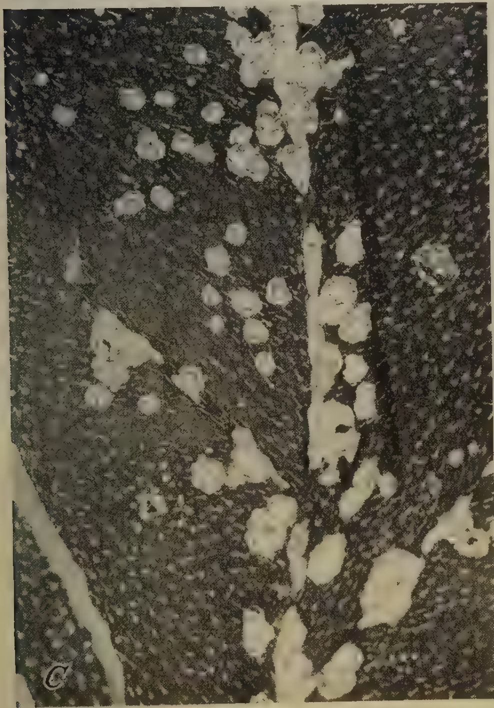

c
a
C


a
D


a
E

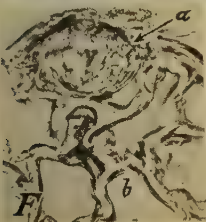

a
F


A
B


C

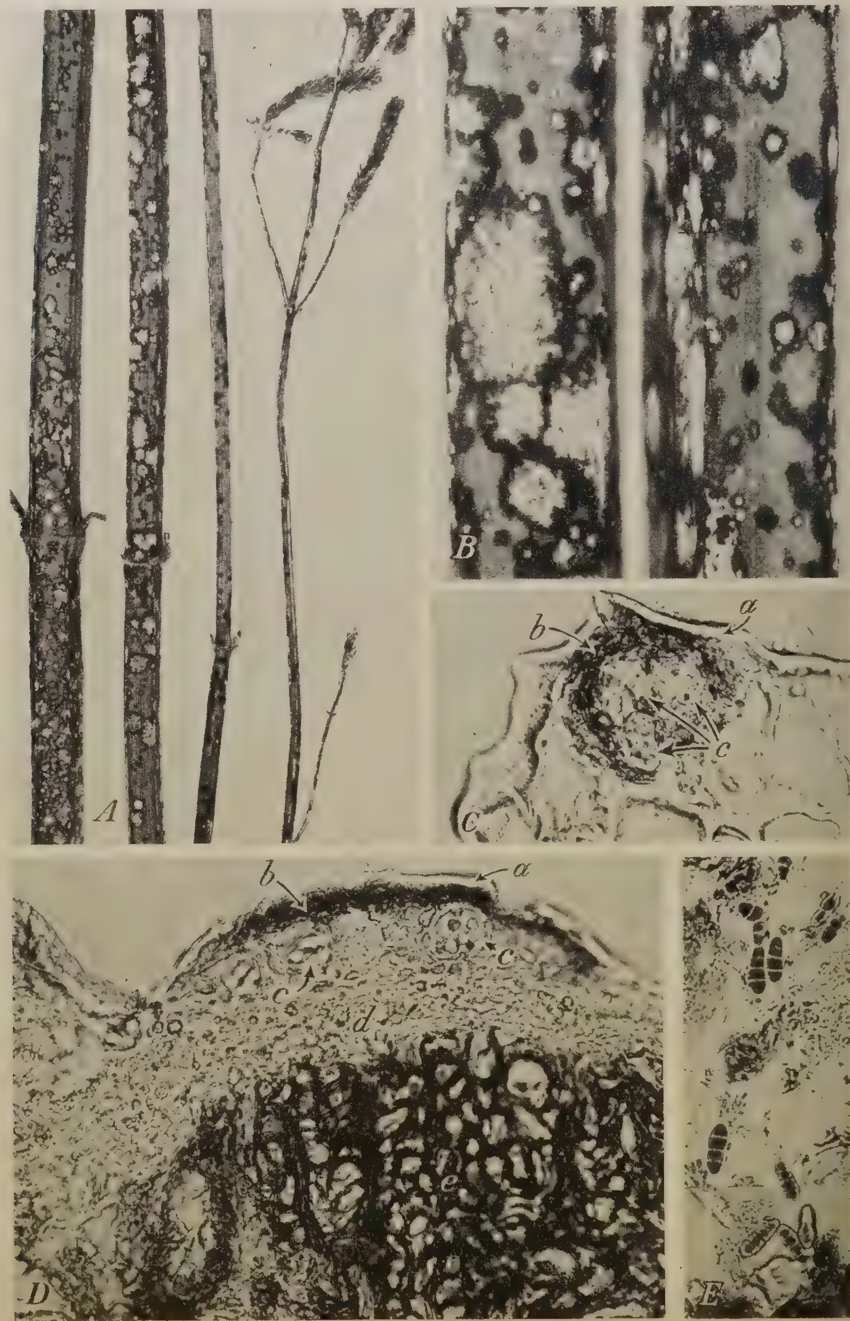

D


a
b
E

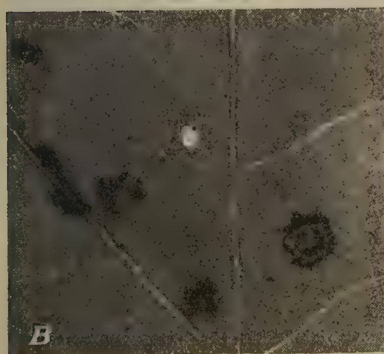

a
b
F

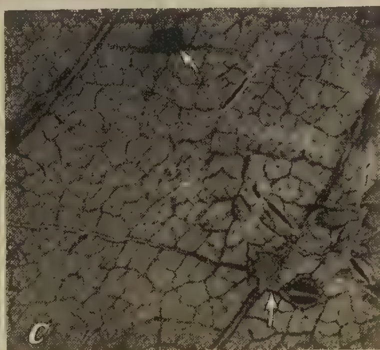

a
c
b
G

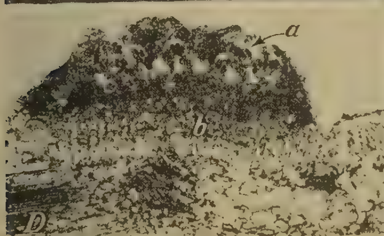

c
a
b
H


A
B
a
b
c
c
a
b
c
c
d
e
D
E


A

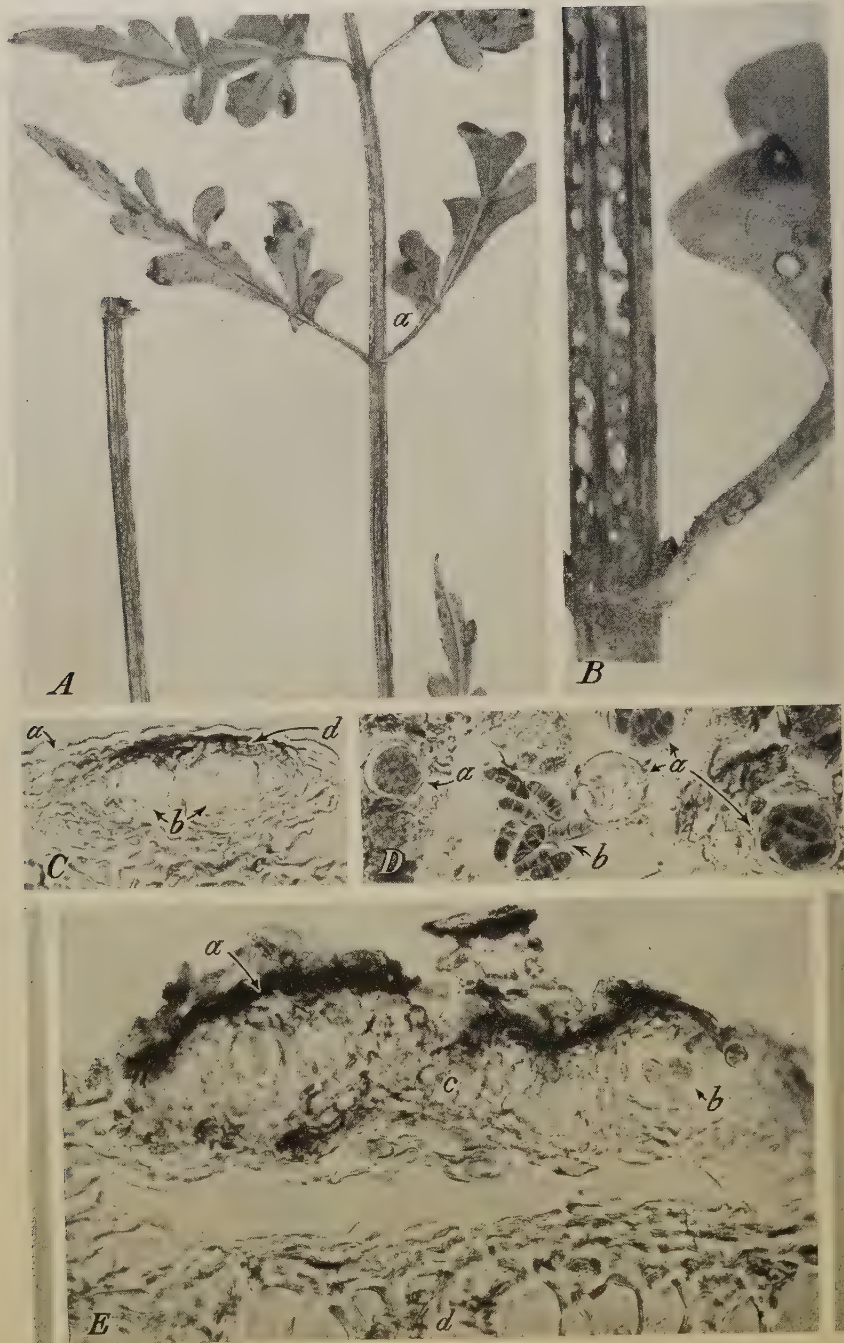

B

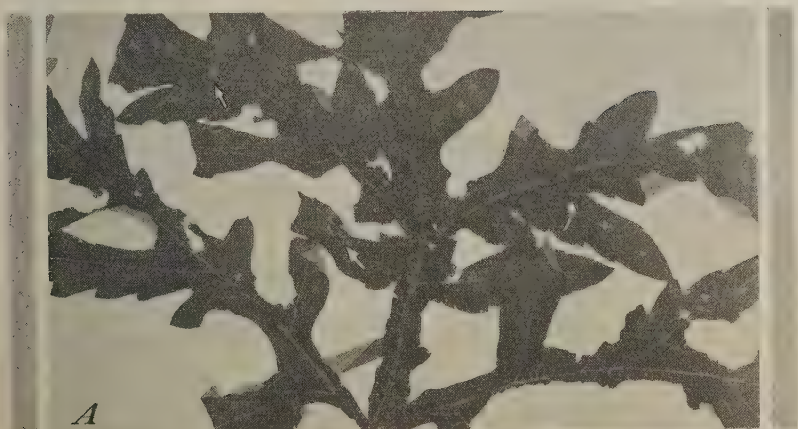

C


a
b
D


E


F

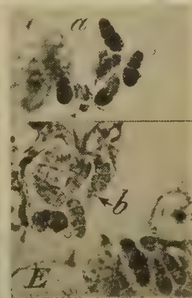

a
A
B
a
d
b
C
a
a
b
D
a
c
b
E
d

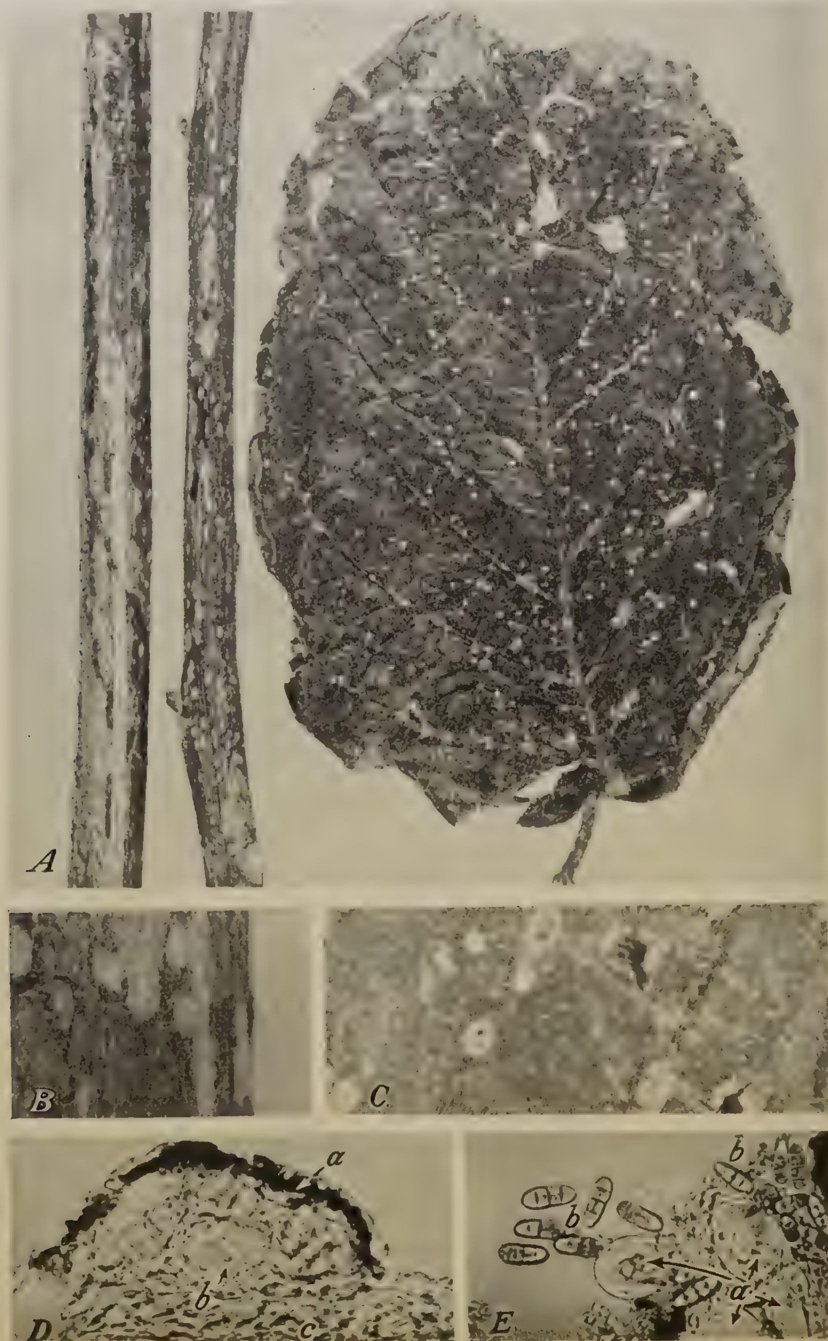

A


B


a
a
C

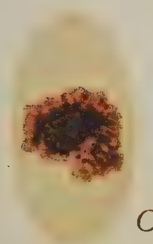

a
b
c
d
D

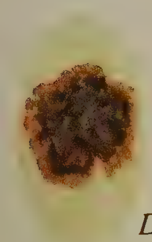

a
b
E

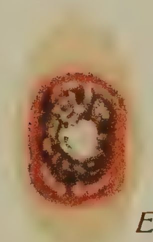

A
B
C
a
b
c
D
b
b
a
E

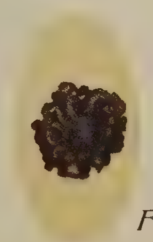

A


B


C


D


E


F

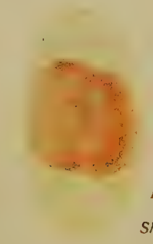

G


H

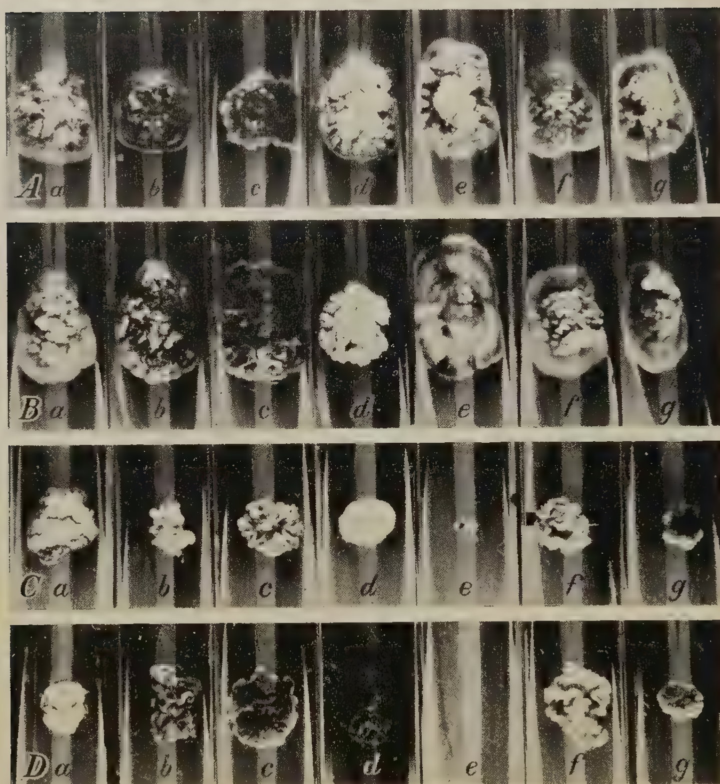

I

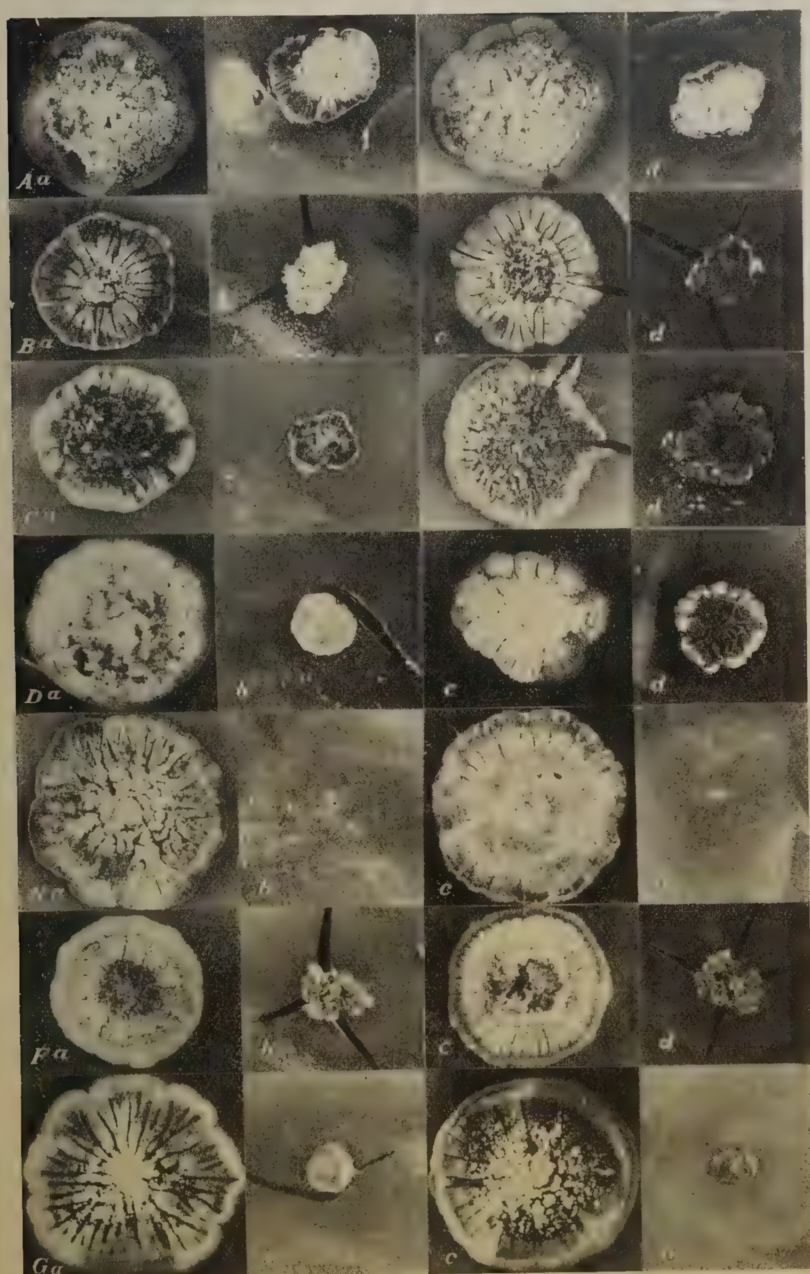

J


K


L

Shull


A a
b
c
d
e
f
g
B a
b
c
d
e
f
g
C a
b
c
d
e
f
g
D a
b
c
d
e
f
g


A a
B a
b
c
d
d
D a
b
c
d
b
c
F a
b
c
d
G a
c

REDESCRIÇÃO DO "NEOLECANIUM SILVEIRAI (HEMPEL)" (HOMOPTERA-COCCOIDEA), SÉRIA PRAGA DA VIDEIRA, E SEU CONTROLE

POR

H. S. Lepage e M. T. Piza

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto e estampas 18-19

Nêstes dois últimos anos apareceu, numa propriedade agrícola de Araraquara, uma nova praga da videira — o *Neolecanium silveirai* (HEMPEL). Êste coccídeo ataca as partes subterrâneas da videira, sendo, por êsse motivo, de dificil combate.

Já HEMPEL, em 1900, quando descreveu êste coccídeo, previu essa dificuldade. Embora tenha sido observado apenas em uma pequena propriedade, o inséto afigura-se como séria praga, porquanto, alí passou das raizes da videira para as de figueira, abacateiro e outras plantas cultivadas.

O material, que serviu de base à descrição original da espécie por HEMPEL, constou de raizes de videira atacadas procedentes de Minas Gerais, onde o coccídeo, naquela época, (1900), já havia sido constatado em Séte Legôas e Diamantina.

A sua erradicação em Araraquara torna-se necessária e urgente, havendo tambem necessidade do levantamento da área de disseminação do coccídeo, que possivelmente se encontra em outras localidades, não só no Estado de S. Paulo, como no de Minas Gerais.

A maior dificuldade no combate reside nos hábitos subterrâneos da praga, sendo dificil a identificação das plantas atacadas sem o revolvimento da terra. O coccídeo já foi encontrado até a 90 cms. de profundidade, no sólo, e só poderá ser atingido por inseticidas gazósos pesados, tais como o bisulfurêto de carbôno, o bromurêto de metila, o paradiclorobenzol, etc.

Na chacara do Sr. LUPO, em Araraquara, onde se acha o fóco do *Neolecanium silveirai*, foram experimentados o bisulfurêto de carbôno e o paradiclorobenzol em dóses variáveis, de 15 a 60 grs. por pé.

Constatamos que o bisulfurêto de carbôno não é tão eficiente quanto o paradiclorobenzol, mesmo quando aplicado em maiores dóses. O paradiclorobenzol, na proporção de 50 grs. por pé, espalhado em sulco distante 20 cms. do tronco, deu ótimos resultados, matando todos os insétos. As dóses menores não deram resultados satisfatórios. E conveniente frisar que o bom resultado no combate depende muito da

natureza do sólo. A aplicação deve ser feita em época sêca. Nas experiencias que fizemos, constatamos a presença de forte cheiro de paradichlorobenzol até 60 e 70 cms. de profundidade, 15 e 20 dias depois da aplicação. Convém frisar que fomos auxiliados pela natureza do sólo e absoluta falta de chuvas durante todo êsse período (5 meses).

E' programa da Secção de Vigilância Sanitária Vegetal a erradicação do *Neolecanium silveirai* em Araraquara, tendo para isso tomado todas as providencias para o combate, proibindo ao mesmo tempo a saida de quaisquer mudas da propriedade infestada.

Outro ponto a ser estudado seria a escolha de possiveis cavalos de videiras, resistentes ao inséto.

* * *

A classificação sistemática dos coccídeos pertencentes à familia *Coccidae* ou *Lecaniidae* é baseada quasi exclusivamente em caracteres externos, tais como presença ou ausência de ovissaco, presença ou ausência de camada de cêra protetora, fórma do corpo, (se oval, plano, mais ou menos convéxo), côr, dimensões e hábitos (si aéreos ou subterrâneos). Êsses caractéres, fáceis de verificar, não representam, entretanto, elementos bastantes para uma classificação básica.

As chaves de classificação dos gêneros dessa familia são confusas e dão constantemente margem a confusão de gêneros. Essa confusão está a reclamar uma revisão da classificação após o que numerosas espécies provavelmente mudarão de gênero.

* * *

Gênero *Neolecanium* — Em "Canadian Entomologist", volume XXXIII, pg. 58, 1901, encontramos o trabalho de COCKERELL e PARROT "Table to separate the genera and a sub-genera of *Coccidae* related of *Lecanium*", no qual é dada a seguinte diagnóse para o subgênero *Neolecanium* "Fêmeas mais ou menos convéxas; antenas e pernas ausentes ou mais ou menos rudimentares; fêmea adulta coberta por uma distinta secreção vítrea; tegumento coberto por numerosas glândulas grandes".

No trabalho de T. D. A. COCKERELL (A contribution to the knowledge of the *Coccidae*", publicado em "Ann. and Mag. of National History" (7), vol. IX, pag. 451-453, em 1902, encontramos, à página 452, "*Neolecanium*, PARROT 1901" — êste nome foi proposto para um subgênero de *Lecanium;* parece melhor considera-lo como um gênero válido. Contém ele as seguintes espécies até agora pertencentes à *Lecaninum*: *N. imbricatum* (CKLL.), *N. urichi* (CKLL.), *N. percon-*

vexum (CKLL.), *N. tuberculatum* (TOMS. & CKLL.), *N. silveirai* (HEMPEL).

As duas seguintes são aqui incluidas provisoriamente: *N. chilapidis* (CKLL.) e *N. sallei* (SIGNRET) — Todas elas são neotrópicas.

No Brasil foram assinaladas *N. urichi*, *N. perconvexum* e *N. silveirai.*

* * *

E' a seguinte a descrição do *Neolecanium silveirai* feita por HEMPEL na "Revista do Museu Paulista", vol. IV, 1900, às páginas 424-425:

"*Lecanium silveirai* sp. n."

"Fêmea de contorno subcircular ou oval, côr vermelho-clara. Dorso convéxo, lustroso, com a dérme dura, e coberto de uma camada fina de secreção cerosa. Sôbre o dorso ha um sulco mediano, longitudinal, mas a dérme é deprimida ao redor das partes anais. Fissura anal tem 0,60 mm. de comprimento e os lados contíguos. Duas linhas de secreção branca e pulverulenta partindo da superfície ventral sobem pelos lados. Quando removido do seu lugar de descanço deixa uma mancha redonda de cêra branca. Tamanho dos specimens: comprimento 5 mm.; largura, 3,5 mm.; altura, 2 mm. E' provavel que êstes specimens fossem imaturos, visto que nenhum dêles continha óvos ou larvas. Fervido em uma solução de KOH, a dérme torna-se móle e transparente, ficando chitinisada somente ao redor das placas anais. Antenas e pernas ausentes. Rostro grande e bem desenvolvido, situado entre o primeiro par de espiráculos. Laço rostral comprido, extende-se além das placas anais. Anél anal contém aparentemente 10 pêlos. Placas anais pequenas com os cantos exteriores arredondados, e os lados antero-laterais um pouco mais compridos do que os postero-laterais. Nas márgens ha duas incisões em fórma de ferradura, de cada lado, opostas aos espiráculos, e nestas a dérme é grossa e chitinisada. Os espiráculos estão perto destas incisões e e acham ligados com elas por meio de fieiras pequenas e redondas. As trachéas são grandes e multiformes. Ao redor da márgem do corpo ha duas ou tres carreiras de pêlos finos, cada um dos quais nasce de um tubérculo. Toda a dérme é coberta de numerosas glandulas grandes e redondas em fórma de mâmas . Estas têm a côr pardo-clara, com um centro claro. Espalhados no meio dessas glandulas ha diversos pêlos e numerosas glandulazinhas filamentosas e delgadas.

Hab.: Sete Lagôas e Diamantina, Estado de Minas Gerais. Nas raizes das videiras, onde causa muito prejuizo. As raizes da videira Izabella parecem as mais afetadas. Os specimens foram colecionados pelo Sr. Amandio Sobral, e o Dr. Campos da Paz conhece uma doença por muitos anos atribuida a êste inséto. Esta espécie é de interesse particular para os agricultores e entomologistas, do ponto de vista economico, e será dificil combate-la, por causa de seus costumes subterrâneos.

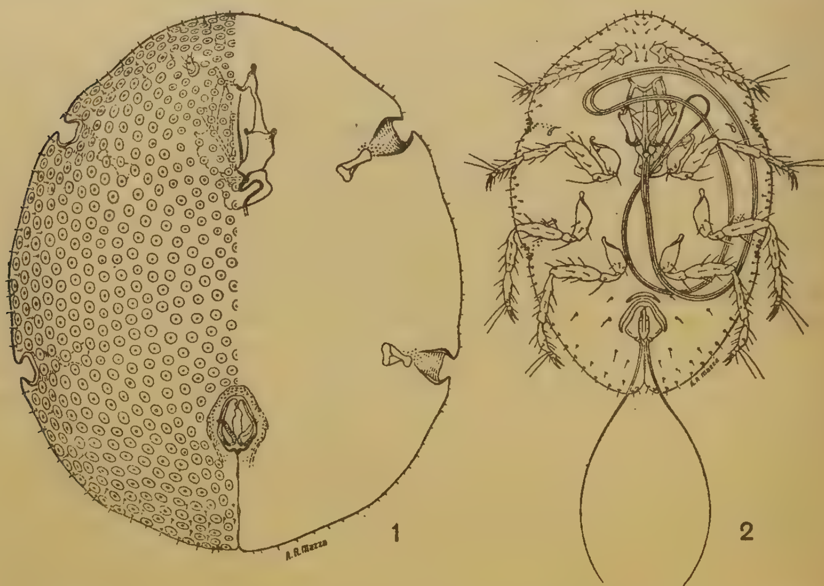
Parece intimamente relacionada com *L. urichi*, mas infelizmente não temos nenhum specimen dessa espécie na nossa coleção".

* * *

Aproveitando o abundante materiàl que colhemos em Araraquara, completamos a seguir a descrição da espécie, o que não foi feito por HEMPEL, em virtude de não ter esse coccidologista encontrado o inséto em todas as fases de desenvolvimento.

Neolecanium silveirai (HEMPEL, 1900)

Fêmea adulta de contorno mais ou menos circular, um pouco eliptica, convéxa, medindo 5 a 6 mm. de comprimento por 4 a 5 de largura e por 2,5 a 3 de altura. E' de côr castanho-avermelhada, lisa uniforme, recoberta por



Neolecanium silveirai (HEMP.). Fig. 1 — Fêmea adulta, muito aumentada. Fig. 2 — Larva (× 55).

tênue camada de cêra. O corpo é bastante convêxo, globoso mesmo, com uma ligeira depressão na sua parte posterior, que corresponde à fenda anal. Lateralmente, nas márgens do corpo. encontramos, de cada lado, duas pequenas incisões que correspondem às incisões estigmáticas e por onde vemos aparecerem filamentos brancos de cêra. Quando a fêmea é destacada da raiz, deixa sôbre esta quatro linhas branca em fórma de X, correspondentes aos estigmas.

Fervida na potassa a 10%, a dérme torna-se mole e transparente, com excepção das placas anais, de uma estreita área em volta destas, e das quatro incisões estigmáticas.

As duas faces do corpo são próximas; a face dorsal é convéxa e a ventral, côncava.

Na fêmea adulta as pernas são ausentes e as antenas, representadas por minúsculos tubérculos. Partes bucais normais quanto a fórma e posição, situadas entre os estigmas protorácicos.

Os estigmas meso e metatorácicos acham-se na face ventral e são normais. De cada estigma, estendendo-se até as margens laterais do corpo, encontramos um distinto sulco ou "canela" que apresenta numerosas glandulas que secretam cêra ou espiracerores. Na margem externa encontramos, de cada lado, duas indentações chitinizadas correspondentes à canela. Essas indentações são tambem conhecidas por depressões espiraculares ou cavidades espiraculares. A cêra secretada pelos espiracerores frequentemente progeta-se com uns filamentos brancos fóra do nivel do corpo, sendo, pelo contraste da côr, perfeitamente visiveis a olho nú.

Da mesma maneira que o torax. o abdomen da fêmea adulta não apresenta segmentação. Não havendo pernas, torna-se mesmo dificil a separação entre o torax e abdomen, a não ser pelos estigmas metatorácicos.

Os caracteres mais importantes do abdomen são a presença da fenda anal e placas anais. A fenda anal méde cêrca de 0,6 milímetros, suas márgens são contíguas, não suturadas, representadas por uma linha nítida. Na extremidade interna da fenda anal, encontramos as placas anais, de fórma triangular, colocadas adjacentemente de cada lado da extremidade cefálica da fenda anal. As placas anais são triangulares, com os 2 ângulos agudos e o ângulo externo arredondado e obtuso.

As placas são chitinizadas, principalmente nos seus bórdos. Circundando as placas encontramos uma zona estreita, tambem chitinizada, onde existem pequenas glandulas. O anus é situado no interior do corpo, circundado por um distinto anel, no qual encontramos 10 cerdas anais, de comprimento igual. Na face dorsal o corpo da fêmea adulta é marchetado de glandulas arredondadas em fórma de discos ou botões, que lhe dão aspécto característico.

A larva é pequena, ativa, de côr rósea, de fórma elítica, com antenas e patas desenvolvidas.

O contôrno do corpo da larva é cercado de pequenos espinhos, havendo de cada lado do corpo duas pequenas reentrancias ou incisões ao nivel dos estigmas, em cuja márgem ha 3 a 4 espinhos curtos e gróssos. Entre as incisões e os estigmas ha numerosas glandulas estigmáticas.

Antenas alongadas, com 5 segmentos, sendo o 3.º bem mais longo que os outros. No 4.º e 5.º ha numerosos pêlos.

Pernas alongadas e normais. Fenda anal curta. Placas anais triangulares, grandes, com longa cérda terminal, que ultrapassa muito a extremidade do corpo, e outras menores. Anel anal com 6 pêlos.

Fêmea preadulta arredondada, deprimida, de côr avermelhada, lembrando mais a forma adulta que a larva. Apresenta antenas representadas por pequenos tubérculos com pêlos. Pernas tambem representadas por pequenos tubérculos com pêlos, pouco perceptiveis.

Os restantes caracteres, semelhantes aos da fêmea adulta, inclusive a dérme, que se apresenta marchetada de glandulas em fórma de discos.

Macho — escudo masculino de côr branca assetinada, medindo 2 mm. de comprimento por 1 mm. de largura e 1 mm. de altura, de fórma elítica. O escudo masculino é dividido em áreas simétricas por linhas nítidas.

O macho adulto é semelhante aos machos das demais espécies dêste gênero.

REDESCRIPTION OF "NEOLECANIUM (HEMPEL) (HOMOPTERA-COCCOIDEA), A SERIOUS PEST OF VINE, AND ITS CONTROL.

Abstract

The present paper deals with a redescription of Neolecanium silveirai (HEMPEL), *a serious pest of vine, and its control.*

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 18

Fig. *A* — Raiz de videira atacada pelo *Neolecanium silveirai* (HEMPEL) x 3.
Fig. *B* — Vista das videiras atacadas em Araraquara.

Estampa 19

Controle do *Neolecanium silveirai* (HEMPEL) em Araraquara — Aplicação do Paradiclorobenzol nas videiras atacadas.
Figs. *D* e *E* — Aplicação do inseticida (50 grs. por pé).
Fig. *C* — O coccideo presente nas raizes até 90 cms. de profundidade.

(H. S. Lepage, fot.)





A



B


C


D


E

Vol. 12 — Art. 8 Outubro 1941

SOBRE AS VARIANTES DO VIRUS X DAS BATATINHAS NO ESTADO DE SÃO PAULO [1]

POR

K. Silberschmidt, N. R. Nobrega e M. Kramer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 20-25

INTRODUÇÃO

Durante os anos de 1936-1939 tivemos ocasião de inspecionar inumeros batatais, no Estado de S. Paulo, afim de verificar o estado sanitario das plantas. Durante esse periodo trouxemos a laboratorio material recolhido de muitos pés doentes ou suspeitos, com o fim de averiguar, mediante inoculações artificais, a ocorrencia dos diversos tipos de doenças de virus, no Estado. Em grande numero de casos tais plantas suspeitas acusaram elevado teôr de virus Y, o que demonstra que esse virus está assás difundido nos batatais paulistas, onde determina consideraveis prejuizos. [2]

Em alguns casos, porem, as inoculações artificiais executadas no laboratorio com suco das batatinhas suspeitas, em plantas sadias de *Nicotiana tabacum* e de *Datura stramonium*, provocaram sintomas bem diferentes dos geralmente causados pelo virus Y. Uma comparação desses sintomas com os descritos na literatura indicou desde logo a ocorrencia, nestes casos, do virus X das batatinhas.

Este virus, que se encontra disseminado pelos batatais de quasi todo o mundo (*Fleckmosaik* da literatura alemã, *Potato Acronecrosis Virus* dos autores holandêses, *Simple Mosaic Virus* da literatura irlandêsa, *Healthy Potato Virus* dos autores americanos) pode causar efeitos patogenicos tão fortes e em tal extensão, que hoje em dia é considerado como um dos principais fatores da degenerescencia das batatinhas.

O primeiro objetivo dos estudos que realizámos, consistiu na comparação de inoculos obtidos de diferentes fontes do virus X encontradas no Estado, com duas amostras desse mesmo virus, já identificadas, e recebidas por gentileza dos Snrs. T. P. DYKSTRA (do Department of Agriculture, Washington, Estados Unidos) e do Prof. H. M. QUANJER (do Labor. voor Phytopathologie en Aardappelonderzoek, Wageningen, Holanda).

---

1 — Trabalho apresentado para o volume jubilar do Prof. ROCHA LIMA (Arq. Inst. Biol., Vol. 11, 1940).

2 — Em outro trabalho apresentaremos os estudos detalhados relativos aos virus desse grupo.

Quizemos ao mesmo tempo verificar tambem se os inoculos que estudavamos eram de fáto, diferentes entre si. Estes inoculos [1] podiam ser tanto constituidos de variantes diferentes ou apenas de amostras diferentes que continham talvez sempre as mesmas variantes, porem misturadas em proporções desiguais em cada amostra.

A decisão desta questão, embora de carater mais teorico do que pratico, seria atualmente de grande interesse para melhor compreensão da natureza do virus. Na verdade, verifica-se da literatura que ha duvidas a respeito do problema de poderem formar-se constantemente, de um determinado virus, novas variantes, ou realizar-se a mutação do virus sómente em condições excepcionais. No primeiro caso poder-se-ia, pois, admitir a existencia de inumeras variantes do virus, ao passo que no segundo, devido ao numero limitado de variantes distintas, deviam-se considerar as nossas amostras como compostas das poucas variantes fixas do virus. Antes de comunicar as experiencias que podem, talvez, servir como uma contribuição para a solução desses problemas, passaremos a resumir, agora, algumas indicações da literatura com referencia ao virus X e suas variantes.

HISTORICO

Desde que H. M. QUANJER (17, 1913) demonstrou que a doença chamada "enrolamento" da batatinha era causada por um agente infeccioso da natureza de um virus, grande numero de trabalhos foi dedicado ao estudo das doenças de virus dessa planta. Com referencia ao grupo das doenças de virus das batatinhas que provocam um mosqueado nas folhas, um unico virus foi considerado pelos primeiros autores, como causador de tais doenças.

Deve-se a KENNETH M. SMITH (19, 1931), a demonstração de que muitas doenças das batatinhas, observadas em condições naturais, são causadas pela ação simultanea e complexa de mais de um virus. No mencionado trabalho K. M. SMITH estabeleceu a diferença entre dois virus que podem causar doenças do tipo de "mosaico" em batatinhas, aos quais chamou virus X e virus Y. Com esses dois virus realizou ele, separadamente, experiencias de inoculação em plantas hospe-

1 — Damos a seguir a explicação do sentido em que são por nós aplicadas as palavras *inoculo*, *amostra* (ou *variedade*) e *variante*:

Inoculo — é o suco prensado de uma planta doente contendo virus de natureza ainda não determinada.

Amostra ou *Variedade* — é um inoculo que produz sintomas sempre iguais, nas plantas da mesma especie empregadas nas sucessivas repicagens. Uma amostra ou variedade pode conter ou uma variante pura ou uma mistura constante de diversas variantes.

Variante — é uma amostra uniforme e perfeitamente definida com relação aos sintômas produzidos "in vivo" e às qualidades fisicas "in vitro".

deiras fornecendo ainda uma descrição detalhada dos sintomas assim provocados. Tambem inoculou, simultaneamente, plantas hospedeiras com os dois virus, provocando nelas, dessa maneira, uma doença complexa muito severa.

Já antes da publicação de K. M. SMITH, J. JOHNSON (2, 1925) havia provado, por experiencias de inoculação, a presença de um virus, em estado latente, em batatinhas aparentemente sadias de quasi todas as variedades americanas. Mais tarde verificou-se pelos trabalhos de J. JOHNSON (3,1929), K. L. KOCH (4, 1933), J. H. H. VAN DER MEER (22, 1932) e outros, que o virus existente numa forma mascarada em tuberculos de diversas variedades de batatinhas americanas, provoca sintomas muito fortes em outras variedades, e que esse virus é identico ao virus X descrito por K. M. SMITH. Este autor, em seu primeiro tratado (20, 1933), já se refere a esse virus como um dos principais componentes dos complexos que causam doenças de degenerescencia das mais severas, na batatinha.

O virus X foi considerado, nos primeiros trabalhos, como sendo uniforme. K. L. KOCH (4, 1933), porem, conseguiu obter a separação dele em dois componentes, que denominou "virus mottle" e "virus ringspot". O mesmo autor evidenciou que esses dois tipos de virus atacavam as mesmas plantas hospedeiras e que as respetivas qualidades fisicas "in vitro" eram bastante analogas.

As principais diferenças entre os virus "mottle" e "ringspot", verificadas por KOCH, residem no fáto de causar o primeiro desses virus apenas sintomas cloroticos nas plantas hospedeiras e resistir, "in vitro", á temperatura de 70°C, ao passo que o virus "ringspot" produz, nas mesmas plantas, sintomas necroticos sob a forma de aneis, e tem o ponto termal de inativação já aos 68°C. KOCH não teve duvidas de que os tipos "mottle" e "ringspot" eram dois virus especificamente diferentes. Diante, porem, do fáto de serem as diferenças entre os virus chamados "mottle" e "ringspot", demasiadamente pequenas para serem reconhecidos ainda hoje, do ponto de vista sistematico, como virus diversos, temos que consideral-os como as duas primeiras variantes distintas do virus X.

A partir da divulgação desse trabalho de KOCH, muitos autores se dedicaram ao estudo da variação do virus X. No mesmo ano em que o trabalho de KOCH foi publicado, R. W. BÖHME (1, 1933) verificou diferenças nitidas entre quatro inoculos de virus X, provenientes de três diferentes variedades de batatinhas, na Alemanha. BÖHME,

que baseava a diferenciação dos tipos no carater mais ou menos necrotico dos sintomas que provocavam em plantas hospedeiras, considerou esses tipos já como diferentes "variantes" estaveis de um só virus. As diferenças verificadas entre os quatro tipos eram, pois, de ordem puramente sintomatologica e não se referiam ás qualidades fisicas das amostras.

Ainda no mesmo ano, E. KÖHLER (5, 1933), tambem na Alemanha, iniciou estudos comparativos muito detalhados sobre as diferenças entre os inoculos obtidos de diversas fontes do virus X. Tal como no trabalho de BÖHME, tambem nos primeiros estudos de KÖHLER (5, 6) a diferenciação das varias amostras do virus X era baseada principalmente no gráu de severidade dos sintomas que produziam.

Em trabalhos mais recentes KÖHLER dedica atenção especial ao problema das condições e da maneira em que se dá a formação de novas variantes dos virus X. Nos anos de 1935-1937 (7, 8, 9, 10 e 11) tentou ele provar que amostras perfeitamente puras do virus X dão origem, no curso das repicagens, a variantes mais fortes ou mais fracas, que em geral ficam misturadas dentro da planta hospedeira com a variedade original, mas podem, por metodos adequados, ser dela isoladas. A capacidade das amostras na produção de novas variantes pode ser aumentada pela exposição do virus, "in vitro", a temperaturas elevadas até proximo do ponto termal de inativação. KÖHLER (11, 1937) explicou a produção de novas variantes do virus X, baseando-se na hipotese de sofrer a constituição da proteina contida no virus, alterações da ordem de associações e dissociações e tornarem-se essas alterações quimicas perceptiveis pela formação de novas variantes.

Se em seus primeiros trabalhos acreditou KÖHLER que todas as variantes do virus X tinham as mesmas qualidades fisicas e mostravam apenas diferenças em relação aos sintomas apresentados, mais tarde verificou que certas variantes tinham um ponto termal de inativação mais elevado do que outras (10, 1937), e chegou a dividir a totalidade das variantes que estudou, em dois grupos: no primeiro a inativação termal se realiza em temperaturas acima de 65°C, enquanto as variantes do segundo grupo sofrem uma inativação somente em temperaturas acima de 70°C. Esses dois grupos correspondem, portanto, mais ou menos, aos dois tipos do virus X anteriormente descritos por KOCH. As variantes estaveis do virus X descritas por PUTNAM (16, 1937), que realizou estudos sobre a ocorrencia de variantes do virus X no Canadá, poderiam ser tambem incluidas nestes dois grupos.

A opinião de KÖHLER, que admite a existencia de um numero quasi ilimitado de variantes do virus X, distinguiveis não só por carac-

teres sintomatologicos, mas até pelas qualidades fisicas "in vitro", encontrou uma oposição bastante forte na extensa monografia que R. N. SALAMAN (18, 1938) dedicou ao assunto. Das suas minuciosas pesquisas tirou SALAMAN a conclusão de que existem apenas seis variantes do virus X e que os tipos multiplos, e às vezes constantes, observados na natureza, nada mais são do que misturas dessas variantes. O mesmo autor não conseguiu, no entanto, observar diferenças muito acentuadas a respeito das qualidades fisicas das variantes puras do virus X, que ele havia separado orientando-se simplesmente pelos sintômas carateristicos que elas constantemente provocavam em diversas plantas hospedeiras.

KÖHLER, porem, nos seus ultimos trabalhos (12, 13, 1939), não concorda com essas ideias e fornece novos argumentos em favor de sua opinião anterior, de que a formação de novas variantes é um fenomeno relativamente frequente, que pode ser até provocado, voluntariamente, pelo experimentador. Acredita na ocorrencia de dois tipos de variação do virus X, um dos quais não altera as qualidades fisicas do virus, ao passo que o segundo dá origem a variantes que se distinguem dos tipos originarios por qualidades fisicas notavelmente alteradas.

Em seu ultimo trabalho, KÖHLER (13) passou a distinguir já quatro grupos de variantes do virus X que são caraterizadas pelas suas qualidades fisicas.

Resumindo, finalmente, o atual estado do problema da "variação" do virus X, podemos afirmar que todos os autores concordam em admitir a existencia de variantes desse virus, fixas e constantes no curso de diversas passagens. Sobre o problema da maneira e da frequencia com que surgem tais variantes ainda ha, porem, muita controversia entre os autores especializados no assunto.

MATERIAL E METODOS

As plantas doentes que constituiram o material para os estudos do virus X forneceram nove inoculos que foram utilizados nas experiencias de inoculações artificiais. Esses inoculos provieram das seguintes origens:

1)* *Ca. 193* A_5 — de *Solanum tuberosum*, holandêsa, variedade não determinada, colhida em Cascata (São Paulo) em Abril de 1938.

* Denominações dadas por nós para maior facilidade de diferenciação no estudo dos diversos inoculos de virus.

2)* *Ca. 53/1* — de *Solanum tuberosum*, holandêsa, variedade não determinada, colhida em Cascata (São Paulo) em Abril de 1938.

3)* *Eig. 1223* — de *Solanum tuberosum*, variedade Eigenheimer, colhida em S. Paulo (Capital) em Abril de 1938.

4)* *Ind. 401* — de *Solanum tuberosum*, da Argentina, variedade não determinada, colhida em Indaiatuba (São Paulo) em Setembro de 1938.

5)* *"Maj."* — de *Solanum tuberosum* variedade Majestic, proveniente dos EE. Unidos (Dezembro de 1938).

6)* *St. T.* — de *Solanum tuberosum*, holandêsa, variedade não determinada, colhida na Cantareira (Capital) em Janeiro de 1939.

7)* *Eig. O. S.* — de *Solanum tuberosum* variedade Eigenheimer, colhida em Cabras (São Paulo) em Fevereiro de 1939.

8)* *"Eerst."* — de *Solanum tuberosum* variedade Eersteling, proveniente da Holanda (Abril de 1939).

9)* *G. M. 1* — de *Solanum tuberosum*, variedade Green Mountain, da Argentina, colhida em Tremembé (Capital) em Junho de 1939.

Visando a identificação dos virus contidos nos inoculos dos materiais já discriminados, fizemos a inoculação de cada um deles em plantas suscetiveis, de diferentes especies. As especies mais frequentemente empregadas foram as seguintes:

Nicotiana rustica, Datura stramonium, N. tabacum (variedades White Burley, Havana e Samsun), *N. digluta, N. glutinosa, Solanum lycopersicum, Capsicum sp.* e *Solanum nodiflorum.*

As plantas a serem inoculadas, foram sempre escolhidas dentre as mais jovens, sadias e robustas, plantadas previamente em pequenos vasos cheios de uma mistura de terra e terriço esterilisado. Marcou-se então, com uma etiqueta, a folha a ser inoculada, de cada uma dessas plantas, sendo de preferencia escolhidas as mais novas.

As plantas usadas nas experiencias foram criadas em estufas e fumigadas periodicamente, até a data das inoculações. Depois disso foram levadas para caixas especiais de proteção contra insétos. Três dos modelos empregados por nós, são representados na estampa 25, figs. *A*, *B* e *C*.

O suco das plantas doentes que se desejava estudar, foi quasi sempre obtido da maneira usual, isto é, triturando-se, em almofariz

esterilizado, folhas cortadas antes em pequenos pedaços, juntando em seguida agua distilada (em numero de c.c. igual ao peso em gramas, das folhas) e espremendo-se depois a pasta obtida em um pedaço de etamine, de forma a se receber o suco dentro de uma pequena caixa de Petri. Obtinha-se assim um suco normal de diluição 1:1.

As inoculações foram executadas por meio de uma bolota de algodão esterilisado, presa por uma pinça comum. Essa bolota era então embebida no suco contido na caixa de Petri, e em seguida friccionada fracamente sobre a superficie da folha a ser inoculada. Esta folha tinha sido antes levemente salpicada com um abrasivo (Carborundum). Durante esse friccionamento (inoculação) a folha era suportada inferiormente por meio da tampa esterilisada da propria caixa de Petri que continha o suco, sendo essa tampa utilizada somente para um unico inoculo de virus de cada serie.

A variação do periodo de latencia até o aparecimento dos primeiros sintomas da doença para cada planta indicadora do virus obrigava a observações quotidianas a partir da inoculação. Uma vez surgidos os primeiros sintomas locais, iniciavam-se os registros das observações, e daí por diante faziam-se as observações periodicamente.

Finalmente, devemos mencionar que, para o estudo acurado de cada um dos materiais por nós colecionados, foi necessario efetuar muitas repicagens nas varias plantas indicadoras. Em media, cerca de 15 repicagens foram realizadas ao todo com o inoculo de cada uma das diversas fontes do virus. Um exemplo esquematico dessas repicagens se encontra na tabela 3.

IDENTIFICAÇÃO DO VIRUS NOS DIVERSOS INOCULOS

1) IDENTIFICAÇÃO A PARTIR DAS AMOSTRAS

Antes de entrar em detalhes quanto ás diferenças que os diversos inoculos de virus apresentam entre si, queremos expôr as qualidades que eles têm em comum e que justificam a sua descrição em uma unica publicação. Passaremos, portanto, à verificação dos sintomas que os varios inoculos de virus provocaram em plantas inoculadas artificialmente.

Tratámos com os nossos inoculos um grande numero de plantas hospedeiras do virus, das quais aqui destacamos especialmente as especies *Nicotiana rustica, Datura stramonium* e *N. tabacum* da variedade White Burley, porque tais hospedeiras apresentaram sintomas muito caracteristicos da doença.

Reunimos os resultados obtidos com essas especies, na tabela 1, em que empregamos abreviaturas para caracterizar os sintomas por elas apresentados.

TABELA 1

Sintomas produzidos pelos inoculos nas três principais especies de plantas hospedeiras

	Datura stramonium		Nicotiana tabacum var. White Burley		Nicotiana rustica	
	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os
Ca. 53/1	n,A	En c,v	A	En v	A	En,N, c,V
Ca. 193A5	n,A	En,n v,m	N,A	En,n v	N,a	N V,m
Eig. 1223	En, A	En, v	a	En,N, c,vst	N,A	En c,v
G. M. 1	En, A	En a v,m	n,A	v,m	N,A	N, c,V
St. T	n ,c	v,m	a,C	V,M	a	V,m
Eig. O. S.	a	V,m	n c	V,m	a,c	c,V,m
Ind. 401	n	V,m	a	v,m	n	n, c,V
Maj.	n,A	En, v	n,A	En,N,A, v	N,a	En,N,a v,
Eerst.	C	V,m	C	V,m	a	V,m

Diante de um quadro sintomatologico relativamente complexo, procurámos dar para cada inoculo do virus os sintomas mais caracteristicos em cada uma das três especies hospedeiras.

E' mister frizar de inicio:

1.º) que as indicações de nossa tabela não se referem a uma só serie de experiencias, mas representam o resultado esquematico de muitas repicagens executadas com os nossos inoculos de virus, em numerosos exemplares de plantas, durante varios periodos do ano.

2.º) que na tabela 1 e nas que se seguem, tanto os sintomas produzidos na propria folha inoculada, como os aparecidos nas folhas mais novas, estão representados por abreviaturas. As abreviaturas em maiusculas referem-se aos sintomas numerosos ou pronunciados; os menos frequentes ou menos acentuados foram marcados em minusculas.

Quanto aos sintomas propriamente ditos, esses podem ser divididos em necroticos e cloroticos. Para esses sintomas foram usadas as seguintes abreviaturas:

En, en = Esclarecimento necrotico, isto é, linhas necroticas a principio brancas e depois pardas, que acompanham as nervuras, destacando assim o sistema das nervuras do limbo (fig. *C*, Est. 20).

N, n = Necroses em forma de desenhos, linhas e pontos necroticos em numero variavel (fig. *B* e *D*, Est. 20).

A, a = Aneis necroticos, ás vezes concentricos, brancos ou pardos, de diametro variavel de 2-10 milimetros, contendo ainda tecido verde e em alguns casos com um ponto necrotico no centro (vêr fig. *A*, Est. 20).

C, c = Clorose, em forma de aneis ou placas circulares cloroticas, que incluem muitas vezes um nucleo de tecido escuro. Esses aneis ou placas são frequentemente cortados pelas nervuras. As placas ou aneis têm um diametro de 2-5 milimetros e se localizam por toda a superficie do limbo foliar (figs. *E*, *F*, *G*, Est. 21).

M, m = Mosqueado ("mottling") de areas claras e escuras distribuidas de maneira irregular e pouco conspicua na superficie da folha (fig. *F*, Est. 21).

V, v = Faixas escuras acompanhando as nervuras 1.as, 2.as e 3.as ("veinbanding") formando desenho ornamental que às vezes abrange a folha inteira, ou somente parte dela (fig. *H*, Est. 21).

St, st = Enfezamento de toda a planta ("stunting") causada por um impedimento no crescimento.

Podemos verificar de nossa tabela 1, que todos os inoculos estudados, produziram sintomas de doença, tanto nas folhas inoculadas (Sint. 1.os) como nas folhas mais novas (Sint. 2.os) das tres especies de plantas hospedeiras usadas nestas experiencias. Todavia, não podemos apresentar aqui uma descrição detalhada dos varios tipos de doença observados em todos esses ensaios. Achamos necessario ilustrar, porem, pelo menos num exemplo, a maneira e a sequencia em que os diferentes sintomas, marcados em nossa tabela, se manifestam numa planta inoculada. Escolhemos para esse fim os dados assinalados nos nossos protocolos, a respeito de uma planta de *Datura stramonium* (N.° 3415), inoculada no dia 29 de Novembro de 1939 com o inoculo Ca. 53/1. Notamos nessa planta, que:

9 dias após a inoculação, a *folha inoculada* apresentava alguns aneis necroticos, pardo-claros (diam. = 2-5 mm.), ainda não bem definidos, que incluiam em geral tecido verde não alterado; as *folhas medias* mostravam pequenos aneis necroticos pardos (diam. = 1-2 mm.) e as *folhas novas* tinham clorose e "veinbanding".

14 dias após a inoculação, alem dos sintomas descritos, a *folha inoculada* apresentava ainda pontos necroticos pardo-claros, ao

passo que nas *folhas medias* e *novas* formaram-se pequenos aneis pardos.

19 dias após a inoculação, esses sintomas ficaram sem alteração.

24 dias após a inoculação, alem dos aneis necroticos já descritos, surgiu nas folhas medias um esclarecimento necrotico das nervuras e, finalmente,

37 dias após a inoculação, todas as folhas mostravam um "veinbanding".

O nosso exemplo mostra que os sintomas necroticos se apresentam, em geral, nas folhas inoculadas e nas folhas imediatamente acima delas, enquanto as folhas novas muitas vezes mostram apenas reações cloroticas. Esse é o quadro geral apresentado pela maioria das plantas inoculadas.

Depois desta rapida descrição do quadro sintomatologico produzido por um dos nossos inoculos, na especie *Datura stramonium*, devemos abordar uma questão de importancia fundamental para o nosso trabalho, isto é, o problema de podermos ou não atribuir á ação de um só virus as doenças provocadas pelos diversos inoculos.

O primeiro argumento em favor da ideia de existirem entre os inoculos certas analogias, é que todos esses inoculos produziram sintomas de doença nas três já citadas especies de plantas hospedeiras. Merece destaque, neste ponto, o fato de uma das especies que mostrou sintomas ser *Datura stramonium*, considerada imune ao virus Y das batatinhas. Disso concluimos, pois, que todos os inoculos estudados contêm um virus de um grupo diferente do do virus Y.

Limitámo-nos, até agora, em tecer considerações a respeito do simples resultado positivo das inoculações, sem todavia entrar em detalhes na parte referente à comparação dos sintomas. Essa comparação fornece, no entanto, valiosas indicações quanto à analogia existente entre os nossos inoculos. De fáto, comparando as doenças causadas numa mesma especie pelos varios inoculos do virus, pode-se verificar que os sintomas manifestados não são identicos, porem bastante analogos. As diferenças verificadas referem-se mais ao grão de intensidade do que propriamente ao carater geral desses sintomas. Acerca desse carater podemos verificar elementos identicos nos sintomas produzidos, numa unica especie, por todos os inoculos em estudo. Desses elementos identicos destacamos a formação de aneis necroticos ou cloroticos (A,a e C,c, da tabela 1) e o desenvolvimento de faixas escuras que acompanham as nervuras, "veinbanding" (V e v, da tabela 1). Podemos verificar por essa tabela, que os elementos aqui salientados não só foram provocados pelos inoculos do virus encontrados no

Estado de São Paulo, como tambem pelas duas amostras denominadas "Maj." e "Eerst.", recebidas de outros paizes para servirem como padrões de virus X. Os sintomas por nós observados em *Datura stramonium, N. rustica* e *N. tabacum* var. White Burley correspondem tambem aos já descritos por outros autores (16, 18, 19) para as mesmas especies hospedeiras.

Em resumo, a grande semelhança dos nossos inoculos do virus com os padrões, a suscetibilidade da especie *Datura stramonium* para todos esses inoculos, e o carater anular dos sintomas nas três especies de plantas hospedeiras mencionadas na tabela 1, justificam a hipótese de que todos esses inoculos contenham o virus X das batatinhas.

Essa suposição torna-se ainda mais concreta ante os resultados de inoculações artificiais com outras plantas hospedeiras. A tabela 2, a seguir, reune os resultados dessas experiencias. Nessa tabela foram empregadas as mesmas abreviaturas que na tabela 1. A explicação dessas abreviaturas acha-se na pag. 8. A essa descrição devemos apenas acrescentar que na tabela 2 assinalámos pela abreviatura 0 (zero) as inoculações que não deram resultados positivos, ao passo que indicamos por um — (traço) as series onde, por falta de plantas hospedeiras, ou por outras razões, não foram efetuadas as inoculações.

Todas as especies, cujos sintomas estão indicados na tabela 2, são na verdade bastante conhecidas na literatura como plantas hospedeiras do virus X. Assim, uma das especies citadas, como p. ex. a variedade Samsun de *N. tabacum,* foi usada em larga escala como planta experimental, nas laboriosas pesquizas sobre o virus X, executadas por E. Köhler (7 á 13). Tambem a especie *Nicotiana glutinosa* é considerada, no tratado de Kenneth Smith (21, pag. 344) como uma das plantas indicadoras do virus X. Finalmente, as especies *Solanum lycopersicum, Capsicum annuum* e *Solanum nodiflorum* foram incluidas por R. N. Salaman (18, pags. 146 e 165) nos seus estudos sobre o virus X das batatinhas.

Dessas mesmas especies de plantas hospedeiras fizémos largo uso nas nossas experiencias de inoculação, tendo verificado que todas elas deram resultados positivos. A comparação desses sintomas com os descritos na literatura como caracteristicos para o virus X, fornece ainda mais um argumento em favor da opinião de que todos os nossos inoculos contêm o virus X das batatinhas.

Considerando agora mais detalhadamente os sintomas produzidos pelas especies incluidas na tabela 2, podemos dizer que na maioria das especies aí indicadas, os sintomas não diferiam consideravelmente dos produzidos nas especies que constam da tabela 1. Estas são *Nico-*

TABELA 2

Sintomas produzidos pelos inoculos em uma outra serie de plantas hospedeiras

	Nicotiana tabacum var. HAVANA		N. tabacum var. SAMSUN		Nicotiana glutinosa		N. digluta (N. tabacum x N. glutinosa)		Solanum lycopersicum		Solanum nodiflorum		Capsicum sp.	
	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2 os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os
Ca. 53/1	—	—	a	En,n,a, v st	a	en,N,a, V	O	m	n, c	m	A	n, v,m	N	O
Ca. 193 A5	n,a	En,n,a m	a	En,n,a, m	n,a	n,a,c,V	a,c	v,	n, C	m	A	v,m	N	O
Eig. 1223	—	—	O	v	a	en,N,a v	—	—	—	—	O	n, c,v,m	N	O
G. M. 1	—	—	n,a	v	a	en,n,a V	—	—	n, c	n m	A	v,m	n	O
St. T	n	v,m	a	C,v st	a	n,a V	c	V	C	m	O	v,m	N	O
Eig. O. S.	A	c,v	n,a	O	O	a,c,v	O	v	n C	n m	O	v,m	N	O
Ind. 401	—	—	a	c,v	c	c,v	—	—	—	—	O	V,m	N	O
Maj.	A	a,C	A	en,N,A,C	a	en,N,A,c	—	—	N, c	N C M	O	n V,m	n	O
Eerst.	a	a,c	a	C,v	—	c,V	—	—	n, c	v,m	O	v,m	n	O

tiana tabacum das variedades Samsun e Havana, *N. digluta* (hibrido de *N. tabacum* x *N. glutinosa*) e *N. glutinosa.*

Por outro lado, fazem tambem parte de nossa tabela 2, três especies: *Solanum lycopersicum, Capsicum* sp. e *Solanum nodiflorum,* em que os inoculos de virus provocaram sintomas de um tipo bem diverso.

Com referencia ao *Solanum lycopersicum,* nas folhas inoculadas desta especie notaram-se, 12 dias depois da inoculação, manchas necroticas pardas, irregulares, situadas muitas vezes na proximidade da nervura primaria ou secundaria. Frequentemente observou-se tambem, ao redor dessas necroses, um halo de tecido clorotico (figs. *A, B, D,* Est. 22). Pouco depois, ainda, apareceram nas folhas mais novas necroses semelhantes ás das folhas inoculadas, sempre associadas, neste caso, a um mottling distinto. Todavia as necroses de *Solanum lycopersicum* distinguem-se nitidamente dos aneis necroticos observados nas outras especies, principalmente pela quantidade do tecido que se necrosa. Enquanto nas outras especies as necroses se limitam a aneis delgados, que se assemelham a lesões feitas por agulha e que encerram tecido não alterado, nas necroses de *Solanum lycopersicum* a destruição do tecido compreende a extensão toda da mancha. Tambem SALAMAN refere-se (18, pag. 165), na parte da descrição dos sintomas de virus X em *S. lycopersicum,* a aneis locais severamente necrosados, nas proprias folhas inoculadas, e a necroses de areas inteiras entre as nervuras nas folhas novas, sem contudo entrar em maiores detalhes nessa descrição.

Necroses de um tipo muito severo ocorrem tambem nas folhas inoculadas com qualquer um dos inoculos de virus na especie *Capsicum* sp. Trata-se de circulos largos, de tecido necrotico pardo, rodeando uma area de tecido pardo-claro. No centro da necrose observa-se, muitas vezes, um ponto necrotico escuro. Essas necroses extendem-se, ás vezes, aos dois lados de uma nervura secundaria, de maneira que elas parecem estar cortadas pela nervura. O aspecto dessas necroses, num estado muito prematuro, pode ser verificado na figura *E* (Est. 22), ao passo que na figura *C* (Est. 22), vemos manchas já num estado mais adiantado.

SALAMAN observou tambem a ocorrencia de necroses muito extensas nas folhas inoculadas desta especie, mas apresenta apenas fotografias de estados mais evoluidos dessas necroses, onde as manchas, a principio distintas, coalesceram formando então grandes areas irregulares, necroticas. Por isso, e por falta de classificação exata da especie de *Capsicum* por nós usada, não se pode fazer uma compa-

ração rigorosa entre o tipo de necroses ocorrido nas experiencias de SALAMAN e o observado por nós.

Por ultimo, a observação dos sintomas produzidos por uma parte de nossos inoculos na especie *Solanum nodiflorum*, revelou a ocorrencia de necroses igualmente anulares, pardas, nas folhas inoculadas (Fig. *F*, Est. 22). Os sintomas secundarios apresentados por esta especie consistiram em manchas cloroticas, pouco distintas, de tonalidade amarelada, situadas entre as nervuras secundarias. A respeito desta planta, resultados semelhantes aos nossos foram tambem descritos por SALAMAN (18, pag. 146).

Como resumo geral dos resultados fornecidos pelas nossas tabelas 1 e 2, podemos pois concluir que os sete inoculos do material de virus, coletados no Estado, mostraram em experiencias de inoculação artificial, realizadas em 10 diversas especies e variedades de plantas hospedeiras, grandes analogias tanto entre si como em relação ás duas amostras padrões de virus X, já identificadas, justificando assim a nossa opinião de que todos esses inoculos contêm o virus X das batatinhas.

Para provar plenamente esta hipotese, resta-nos ainda demonstrar que nenhum dos inoculos pesquizados achava-se contaminado por qualquer outro virus, e que as qualidades fisicas do nosso virus correspondem de fato às atribuidas ao virus X.

2) IDENTIFICAÇÃO A PARTIR DAS PROPRIEDADES FISICAS DO VIRUS

Nossas observações quanto às qualidades fisicas do virus "in vitro" limitaram-se a estudos sobre a sua tolerancia ao aquecimento.

Um ensaio desta natureza foi realizado em 25-3-39 com o virus dos inoculos Eig. O.S., St.T. e Ca. 193 A_5. Na preparação dos sucos destes três inoculos foi empregado o método descrito na pag. 6, sendo o suco colocado em pequenos tubos de ensaio e submetido, durante 10 minutos, à temperatura de 56°C. Com esse suco foram inoculadas plantas experimentais, sadias, das especies *N. tabacum* var. Havana, *N. digluta, N. rustica* e *Datura stramonium,* verificando-se então que os sintomas provocados pelos sucos aquecidos corresponderam, plenamente, aos produzidos pelo suco não aquecido. Mais tarde, em 28-9-39, o mesmo tipo de ensaio foi efetuado com os outros inoculos originarios do Estado e, em 4-10-39, tambem com os inoculos padrões "Maj." e "Eerst".

Nestes dois ultimos ensaios achamos conveniente submeter os inoculos a uma purificação mais rigorosa, conservando desta vez os sucos numa temperatura de 60°C e não mais de 56°C, como nos ensaios da primeira serie.

O resultado, porem, mesmo assim, correspondeu perfeitamente ao do primeiro ensaio, indicando que os sintomas provocados em plantas suscetiveis por suco aquecido não diferem dos causados pelo suco normal.

Destes resultados podemos tirar a conclusão de que os nossos inoculos não pertencem ao grupo do virus Y, cuja temperatura de inativação fica situada abaixo de 60°C. Diante do fáto de tolerar o virus X durante 10 minutos, temperaturas de 68°C e até, em certos casos, de 75°C, os nossos resultados não estão em contradição com a opinião de que os inoculos contêm o virus X das batatinhas.

Ao mesmo tempo, as referidas experiencias constituem já o primeiro passo na purificação dos nossos inoculos. Fazendo, pois, repicagens com suco aquecido desses varios inoculos, excluimos a possibilidade deles estarem contaminados por outros virus cujo ponto termal de inativação se acha abaixo de 60°C. Foi por isso que intercalámos, às vezes, no curso das repicagens dos varios inoculos do virus, series em que todos os sucos usados para a inoculações tinham sido submetidos, durante 10 minutos, à temperatura de 60°C.

Um método semelhante, tambem aplicado por nós, com o fim de purificar o virus, consistiu em passar todos os inoculos em questão em plantas da especie *Datura stramonium.* Estas plantas, depois de mostrar sintomas da doença, forneceram o material para as inoculações da serie seguinte. Tais inoculações, feitas com suco de plantas de *Datura stramonium,* excluem, assim como as realizadas com suco aquecido, a possibilidade de estar o virus em estudo, contaminado com o virus Y das batatinhas. Assim, na serie de inoculações do dia 18-4-40, que compreendeu o estudo de todos os inoculos em questão, cada um dos sucos foi preparado de plantas doentes da especie *Datura stramonium.* Os sintomas observados em consequencia das inoculações desta serie, foram similares aos ocorridos em series anteriores ou posteriores. Parece, pois, que os nossos inoculos de virus de fáto não estavam contaminados pelo virus Y das batatinhas.

Alem de purificar os varios inoculos, por passagens sucessivas em plantas hospedeiras que servem de filtros para tipos estranhos de virus, aplicámos ainda, afim de garantir a pureza de nossos inoculos, o método de purificação descrito e usado em grande escala por Köhler (10, pag. 31). Este metodo baseia-se na inoculação de especies de plantas nas quais o virus provoca, mesmo em grandes diluições, sintomas locais necroticos bem distintos. Dá-se então a formação, na folha inoculada, de um numero muito limitado de necroses, separadas uma das outras

por grandes areas de tecido sadio. Na suposição de que as necroses assim obtidas sejam o resultado da infecção por uma ou pelo menos poucas particulas do virus, ha grande probabilidade de que cada uma das necroses contenha uma só amostra do virus. Cortando então, com uma tesoura esterilizada, uma unica necrose e preparando dela um suco, pode-se esperar a obtenção de um virus altamente purificado.

Aplicando, portanto, essa técnica para as nossas experiencias, realizámos, em 28-2-40, uma serie de ensaios que consistiu em inocular plantas de *N. rustica* com sucos dos nove inoculos de virus diluidos a 1:100. Três semanas mais tarde, isto é, em 19-3-40, cortou-se uma unica necrose, de cada uma das plantas de *N. rustica* inoculadas em 28-2-40. Com suco obtido a partir dessas necroses, inocularam-se a seguir 9 grupos de plantas de *Datura stramonium.*

Uma outra serie de experiencias, em que empregámos o mesmo metodo, mas que só abrangeu dois dos nossos inoculos, já tinha sido executada previamente em 26-1-40. Nessa ocasião inocularam-se sucos diluidos a 1:1000, em plantas de *N. rustica,* e três semanas mais tarde tambem com o suco obtido, cada vez, de uma necrose, inoculámos outras plantas de *N. rustica.*

Verificando-se nesses dois ensaios, que os sintomas obtidos com os sucos diluidos a 1:100 e a 1:1000 não diferiam dos conseguidos com o suco normal, os resultados dessas series vieram confirmar, assim, a nossa opinião de que os inoculos em estudo não continham, desde o inicio, contaminações perceptiveis, de outros tipos de virus.

E' claro que, para provar que os nove inoculos de virus pesquizados continham apenas o virus X das batatinhas, tivémos que fazer grande numero de passagens e repicagens em plantas sadias, seja para observar os sintomas causados em varias especies de plantas hospedeiras, seja com o fim de garantir e manter a pureza das nossas amostras. Devido ao numero relativamente elevado de inoculos comparados, seria impossivel dar aqui a descrição cronologica de todas as passagens.

Para ilustrar, porem, num unico exemplo, o processo usual adotado na identificação das nossas amostras, damos na tabela 3 um esquema das diferentes passagens realizadas com o virus do inoculo *St.T.*

Verifica-se nesse esquema a sequencia das diferentes series e a especie das plantas hospedeiras usadas em cada ensaio. As series que foram submetidas à purificação estão aí assinaladas com simbolos especiais. Passagens correspondentes, em numero ainda mais elevado, foram efetuadas tambem com alguns dos outros inoculos pesquizados.

TABELA 3

Repicagens sucessivas do Inoculo *St. T.*

Solanum tuberosum

10-1-39	N. rustica; *N. glutinosa*; Datura stramonium
11-2-39	*N. glutinosa*; N. digluta
	(△)
25-3-39	N. digluta; *D. stramonium*; N. rustica; N. tabacum, Havana
23-5-39	N. tabacum, Havana; *N. tabacum*, W. Burley; D. stramonium; N. rustica
22-6-39	D. stramonium; *N. tabacum*, W. Burley; N. glutinosa
1-9-39	S. lycopersicum; *N. rustica*; Capsicum sp.
29-11-39	N. tabacum, Samsun; *N. rustica*; D. stramonium
	(▭)
23-2-40	N. rustica; N. tabacum, W. Burley
28-2-40	*N. rustica*
	(O)
19-3-40	*D. stramonium*
18-4-40	*N. rustica*
21-5-40	*S. nodiflorum*; Capsicum sp.
28-6-40	N. rustica; N. glutinosa; N. tabacum, W. Burley

LEGENDA:
(△) — suco submetido a temperatura de 56°C durante 10 minutos.
(▭) — suco diluido 1:100.
(O) — suco feito com aneis necroticos recortados.

Resumindo, ainda uma vez, os resultados destas experiencias, podemos afirmar que todos os inoculos estudados contêm um mesmo virus, que é o virus X das batatinhas.

DIFERENCIAÇÃO DOS VARIOS INOCULOS DO VIRUS

Depois de ter provado, no capitulo anterior, que todos os inoculos de virus incluidos neste trabalho pertencem ao grupo do virus X das batatinhas, devemos expôr em que consistem as diferenças observadas entre esses inoculos.

Supondo que os virus mostrassem variações como as já muitas vezes referidas nas plantas superiores, as diferenças entre os inoculos poderiam ser da ordem de "modificações", (=variações reversiveis causadas por fatôres externos) ou de "mutações" (=variações hereditarias que não desaparecem com a alteração das condições exteriores). Neste ultimo caso os varios inoculos estudados por nós seriam constituidos ou de diferentes variantes ou de complexos das mesmas variantes combinadas entre si em proporções diversas.

Para decidir a questão da natureza da diferença existente entre os inoculos do virus, o unico meio de que dispomos é a verificação da constancia dos sintomas que cada um deles provoca nas repicagens sucessivas executadas em diversas especies de plantas hospedeiras. Por isso, fizémos numerosas inoculações em diversas epocas do ano, com os varios inoculos do virus X, sempre em novas series de plantas sadias das especies suscetiveis escolhidas.

Ora, antes de comunicar os resultados dessas experiencias, devemos expôr ainda quais os fatores que podem dificultar a obtenção e a interpretação desses resultados.

Em primeiro lugar, devemos levar em consideração a desigualdade da reação de plantas da mesma especie, ante um unico inoculo do virus. Se inocularmos por exemplo, 10 plantas de *Nicotiana rustica* com o inoculo Ca.193A_5, os sintomas apresentados pelas 10 plantas podem não ser perfeitamente iguais entre si. Devemos verificar, por isso, se essa variação do material biologico não é demasiado grande para permitir ainda a diferenciação entre os diversos inoculos do material de virus X.

Uma segunda dificuldade para a decisão da questão de serem as diferenças entre os nossos inoculos passageiras ou constantes, reside no fato de que os sintomas produzidos por um inoculo em plantas da mesma especie variam, até certo ponto, em diversas series de experiencias. Isso não é de extranhar, porque o desenvolvimento dos sintomas depende largamente das condições externas (temperatura ambiente,

idade das plantas, tamanho da folha inoculada, etc.) e tais condições não podem ser mantidas absolutamente identicas em diferentes series de ensaios. Surge então a questão de serem as diferenças existentes entre os nove inoculos, assás grandes para se manifestarem, mesmo atravez da variação dos resultados flutuantes de diversas series de experiencias.

Existe ainda uma terceira dificuldade para a diferenciação nitida entre os inoculos, que resulta do fáto do mesmo inoculo do virus não provocar sempre os mesmos sintomas em diversas especies de plantas hospedeiras. Assim, pode dar-se o caso de dois dos nossos inoculos apresentarem diferenças nitidas entre os sintomas provocados em plantas de *N. rustica*, manifestando ao mesmo tempo sintomas absolutamente identicos em plantas de *Datura stramonium*. Em tal caso poder-se-ia duvidar da conveniencia de separar os dois inoculos levando somente em consideração os sintomas causados numa só especie. Eis por que antes de diferenciar os inoculos, se deve estudar a extensão da divergencia que os sintomas por eles causados apresentam em diversas plantas hospedeiras.

Para avaliar todas essas dificuldades, seria quasi indispensavel dar aqui, em todos os detalhes, os resultados obtidos nas diversas series de experiencias, com os nove inoculos de virus estudados, em diferentes especies de plantas hospedeiras. Por falta de espaço é-nos impossivel, porem, adotar esse processo. Reunimos, por isso, na tabela 4, apenas os resultados de duas series de experiencias executadas em diferentes epocas do ano com quatro inoculos do virus X e em três especies de plantas hospedeiras. As indicações dessa tabela diferem das de ns. 1 e 2, devido ao fato de referirem-se aqui, as abreviaturas, a uma unica planta, ao passo que nas primeiras tabelas elas representam a media de resultados obtidos com muitas plantas e em diversas series de experiencias. [1]

Na interpretação dos resultados da tabela 4, vamos começar pela variação individual da reação apresentada pelas diferentes plantas de uma serie. Assim, por exemplo, os resultados obtidos com a inoculação de *N. rustica* em 28-6-40 mostram nitidamente que essa variação não é muito grande. Nesta serie indicamos para cada inoculo os sintomas observados em cinco plantas individuais e verificamos então uma grande analogia quanto ao tipo de sintomas apresentado pelas diversas plantas tratadas com o mesmo inoculo. E' verdade que existem sempre plantas que demonstram reações bem destacadas das manifestadas pelas outras plantas da serie. Tal excepção está

1 — Para entendimento das abreviaturas usadas vide pag. 84.

TABELA 4

Variação individual dos sintomas observados em três diferentes especies tratadas com quatro inoculos do virus X

Plantas hospedeiras	Inoculos		— Ca. 193 A 5 —		— Eig. O. S. —		— Maj. —		— Eerst. —	
	Exp. de	Planta N.º	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os	Sint. 1.os	Sint. 2.os
Nicotiana rustica	29/11/39	I	N,a	N	0	n,c,v	A	En a,c,V	a	n C,v
	»	II	n	En,N,a,c	0	C,V	n	En a,C	a	m
	»	III	n	en,N,a,C	0	C,v	N,a	En a,C	a	N C,v
	28/6/40	I	n,a	N V	0	v,m	N,a	En,n,a v	0	c,V
	»	II	n,A	En,N v	0	c,V,M	N	En,N v	0	V,m
	»	III	n	N,a v,m	0	V,m	0	En,n v	0	en,
	»	IV	N	N V,m	0	c,V	N,a	En,n,a v	n	n,a V,m
	»	V	N,A	n V,m	0	m	N,a	N,a m	0	V,M
Datura stramonium	23/5/39	I	n C	N, m	a	A	A	?	c	0
	»	II	c	En,n, c,v	A	N v	A	v	C	0
	»	III	c	En,n, V	A	n v	A	V,m	c,m	v,m
	29/11/39	I	a	n,a,c	en	en V,m	A	En A,c,V	A	V,m
	»	II	n,a	en,n,a,c	En a	en a V	A	En A,c,V	0	v,m
	»	III	0	n v,m	0	v,m	A	En,N,a V	0	C,V
Nicotiana tabacum var. *White Burley*	23/5/39	I	C	n,A m	N,a,c	V	A	V,M	c	c,v
	»	II	C	n,a,c,V	N,a,c	0	A	V,m	c	v,m
	»	III	C	n,a,C	N,a	m	A	V,M	C	a,C
	28/6/40	I	0	V	n	en,n st V,m	N,A	N,a,c,v	0	m
	»	II	N	en,N,A,c,V	n	V,M	N,A	N,A V	0	m
	»	III	N,a	n,a, V,m	n	st C V	N,A	en,N v,m	0	m

representada, por exemplo, pela planta n.º 4 do grupo de plantas de *N. rustica*, inoculadas em 28-6-40 com o inoculo "Eerst". Essa planta apresentou sintomas nitidamente necroticos, ao passo que os outros pés da serie apresentaram caractéres mais cloroticos. Apezar desses casos contrastantes, pode-se verificar perfeitamente, da observação cuidadosa das plantas de uma série, a reação tipica do inoculo para a referida especie.

Maior importancia para a diferenciação dos inoculos deve-se atribuir, porem, à segunda dificuldade esboçada acima, que consiste na variação dos resultados em diversas series de experiencias. Nota-se, a proposito, que o inoculo "Eerst" produziu, na serie 29-11-39, na folha inoculada de *N. rustica*, aneis necroticos, em oposição ao comportamento do mesmo inoculo na serie 28-6-40, onde deixou de provocar quaisquer sintomas primarios.

A variação dos sintomas em diversas series, realizadas em diferentes epocas do ano, não é porem tão acentuada a ponto de encobrir o carater geral dos inoculos. Pela observação, em conjunto, dos resultados da nossa tabela 4, referentes a *N. rustica*, podemos afirmar, com certeza, que os inoculos "Maj." e Ca. 193 A_5 possuem um carater necrotico, enquanto os inoculos "Eerst" e Eig. O.S. se caraterizam, na mesma especie, pela manifestação dos sintomas cloroticos. Este resultado, verificado em diversas series, mostrou-se independente da época do ano em que se realizaram as experiencias.

Após havermos provado que nem a variação individual entre as plantas de uma serie, nem as flutuações dos resultados existentes entre series sucessivas, impedem a diferenciação dos diversos inoculos do virus X, resta ainda verificar se o mesmo inoculo de virus causa sintomas similares em diferentes especies de plantas hospedeiras. Com efeito, para a diferenciação dos inoculos estudados é importante saber se a diferença dos sintomas causados pelos diversos inoculos do virus só se manifesta entre plantas de uma especie, ou se todas as especies de plantas hospedeiras se comportam sempre da mesma maneira, com relação a todos os inoculos.

Os dados da nossa tabela 4 indicam, sem duvida alguma, que as diferenças que ocorrem entre as plantas de uma especie não correspondem de modo algum, às que se observam entre plantas de outras especies. O inoculo de virus X, Eig. O.S., que produz sintomas extremamente cloroticos em plantas da especie *N. rustica*, já induz reações tipicamente necroticas em *Datura stramonium* ou em *N. tabacum* var. White Burley. Por isso, com referencia à classificação dos nossos

inoculos e tomando por base somente os resultados obtidos na especie *N. rustica,* agrupariamos o inoculo Eig. O.S. entre os de reação clorotica, semelhantes ao inoculo padrão "Eerst". Se nos basearmos, porem, nos resultados das inoculações executadas em plantas de *Datura stramonium* e de *N. tabacum* White Burley, devemos considerar o inoculo Eig. O.S. como causador de reações necroticas, colocando-o por isso proximo ao inoculo padrão "Maj.". Mesmo assim, os sintomas provocados pelos quatro inoculos do nosso virus são, nas 3 especies de plantas hospedeiras aqui estudadas, diferentes entre si, a tal ponto que não se chega a confundir uns inoculos com os outros. Este fáto vem apoiar, pois, a hipotese de constituirem os nossos inoculos diferentes amostras do virus X, que devem ser consideradas provavelmente como originadas antes por verdadeiras "mutações" do que por meras "modificações".

Para simplificar o processo de diferenciação dos inoculos, vamos nos limitar aos resultados conseguidos com as plantas de uma só especie e somente em casos duvidosos consideraremos os resultados obtidos com outras plantas hospedeiras. Nestas condições passaremos agora à tentativa de classificar os nossos nove inoculos do virus X.

Achamos sempre, durante as nossas inoculações artificiais, que a especie *N. rustica* era muito indicada para bem distinguir os sintomas produzidos pelas nossas diversas amostras de virus X. Por isso executámos com esta especie o maior numero de inoculações e considerámos decisivas as reações produzidas nesta especie. Comparando pois os sintomas causados nas folhas inoculadas e nas folhas novas de plantas de *N. rustica,* nas diversas series observadas, e denominando "reações fortes" as manifestações essencialmente necroticas e "reações fracas" as de carater mais clorotico, chegamos a estabelecer a seguinte escala, em que os nossos inoculos estão agrupados de acordo com a severidade dos sintomas:

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ca. 53/1	G. M. 1	Ind. 401
Ca. 193 As	St. T	"Eerst."
"Maj."	Eig. O. S.	
Eig. 1223		

Conforme se verifica nesta classificação, os inoculos estão distribuidos em 3 grupos. O primeiro compreende 4 inoculos nitidamente fortes, o ultimo abrange dois normalmente fracos, enquanto incluimos

no grupo medio 3 inoculos que não possuem carater muito estavel e que geralmente provocam sintomas cloroticos, mas que de vez em quando tambem causam necroses, embora em pequeno numero.

Para facilitar a compreensão das diferenças existentes entre os nossos inoculos de virus, esboçaremos a seguir, resumidamente, os caractéres principais desses inoculos: (Vide Estampa 23-24, figs. A-G)

1) Os inoculos Ca.193A_5 e Ca.53/1 produzem reações identicas ou pelo menos muito semelhantes entre si, provocando necroses em todas as plantas hospedeiras estudadas. Essas necroses consistem, em geral, em aneis necroticos com um ponto necrotico no centro e um esclarecimento necrotico das nervuras. Notámos, em *Solanum lycopersicum,* placas necroticas em lugar de aneis.

2) A amostra-padrão "Maj.", produz sintomas necroticos bem pronunciados nas folhas medias de *N. tabacum* var. White Burley e nas mesmas folhas de *N. rustica.* Nessas folhas mostram-se aneis, pontos e especialmente linhas em zig-zag, necroticas, brancas. Os sintomas locais, necroticos, nas mesmas especies e em *Datura* são menos frequentes do que nas amostras descritas anteriormente. Ocorrem placas necroticas nas folhas inoculadas de *S. lycopersicum,* circulos necroticos pardos nas de *Capsicum,* ao passo que não foram verificados sintomas necroticos primarios em *S. nodiflorum.*

3) O inoculo Eig. 1223 produz necroses anulares em grande numero somente em *Datura stramonium,* ao passo que em *N. rustica* e em *N. tabacum* var. White Burley as necroses são menos numerosas. Ocorrem, alem disso, nestas duas ultimas plantas hospedeiras, circulos cloroticos e faixas escuras acompanhando as nervuras. Faltam sintomas necroticos primarios em *S. nodiflorum.*

4) O inoculo G.M.1 produz reações intermediarias entre as tipicamente necroticas e as exclusivamente cloroticas. Embora nas folhas inoculadas de *N. rustica, Datura stramonium* e de *N. tabacum* var. White Burley se notem ainda muitos aneis necroticos, já nas folhas superiores das mesmas especies predominam os sintomas cloroticos. Foram produzidas reações necroticas em *Capsicum* sp., *S. lycopersicum* e em *S. nodiflorum.*

5) Os inoculos St.T. e Eig.O.S. determinam nas folhas inoculadas de *N. rustica, Datura stramonium* e *N. tabacum*

var. White Burley necroses não só em reduzido numero, mas tambem em pequena porcentagem de plantas inoculadas. Especialmente raros são os sintomas necroticos apresentados pela especie *N. rustica.*

Nos sintomas secundarios das mesmas variedades predominam ainda mais os carateres cloroticos. Tambem em *S. lycopersicum* e em *S. nodiflorum* prevalecem sintomas cloroticos, ao passo que em *Capsicum* sp. notam-se circulos necroticos pardos nas folhas inoculadas.

6) Os inoculos Ind. 401 e "Eerst." provocam, como sintoma principal, nas folhas superiores de *N. rustica, Datura stramonium* e de *N. tabacum* var. White Burley a formação de faixas escuras acompanhando todo o sistema de nervuras principais, secundarias e terciarias. Desenvolve-se, dessa maneira, o desenho chamado por KÖHLER (10, pag. 35), desenho em concha de tartaruga ("Schildpattmuster"). As areas entre as nervuras adquirem, na amostra Ind. 401, uma coloração amarela bem clara, quasi branca. Nas folhas inoculadas observam-se, às vezes, um ou outro anel necrotico. Tambem nas outras plantas hospedeiras, com unica exceção de *Capsicum* sp. verificámos uma distinta predominancia dos sintomas cloroticos.

Desta maneira classificamos os nossos nove inoculos em 6 classes, incluindo três vezes dois inoculos na mesma classe. Devido ao fato de terem essas seis classes mantido caractéres constantes durante as numerosas passagens, não podemos considera-los como meras "modificações", mas sim como amostras do virus X das batatinhas, qualitativamente distintas entre si.

DISCUSSÃO

Procuramos demonstrar, nas paginas precedentes, que as diferenças encontradas entre alguns dos nossos inoculos do virus X são mais do que simples flutuações ocasionais, razão bastante para considerar tais inoculos como diferentes amostras do virus X.

Parece desejavel discutir agora, rapidamente, a questão do valor sistematico que se deve atribuir a essas amostras do virus X e se elas podem ser identificadas com as subdivisões deste mesmo virus, já estabelecidas por outros autores.

Já no historico deste trabalho nos referimos à diferença existente entre a opinião de SALAMAN (18) e KÖHLER (12) a respeito da

frequencia com que se realiza na natureza a formação de novas variantes do virus X.

Ao passo que SALAMAN (18, pg. 188) atribue ao fenomeno da "mutação" (alteração nitida e irreversivel das variantes) uma importancia muito reduzida, KÖHLER no entanto acredita que novas variantes podem derivar com a maior facilidade de amostras antigas do virus X. Uma opinião semelhante foi, recentemente, manifestada por L. O. KUNKEL (14) e W. C. PRICE (15).

Para bem focalisar a diferença entre as opiniões de SALAMAN e de KÖHLER, podemos dizer que para o primeiro desses autores todas as amostras encontradas nas fontes naturais constituem misturas das poucas variantes padrões por ele descritas. Por outro lado, para KÖHLER as amostras observadas na natureza representam, na maioria, variantes distintas que constantemente se formam, mesmo de tipos purificados do virus.

Se quizermos agora comparar as amostras aqui estudadas, com as variantes descritas por SALAMAN e por KÖHLER, devemos sempre ter em mente que o conceito de variante é diferente para cada um desses autores. Para SALAMAN, as variantes diferem entre si quasi exclusivamente pela intensidade com que os sintomas da doença se manifestam nas plantas hospedeiras. As qualidades fisicas das suas variantes não apresentam comparativamente diferenças apreciaveis.

Com esse conceito de variante admitido por SALAMAN, concorda apenas um dos dois tipos de variantes distinguidos por KÖHLER. Este autor (12, 67) acredita ainda na existencia de um outro tipo de variante que difere da amostra original tambem por suas qualidades fisicas "in vitro". KÖHLER verificou que variantes do primeiro tipo ocorrem geralmente em amostras do virus X, que derivam da mesma variedade de batatinha, ao passo que é facil encontrar variantes do segundo tipo, comparando amostras que derivam de diferentes variedades de batatinhas.

Podemos agora orientar-nos para as amostras que estudámos, e aí vamos verificar que elas não correspondem plenamente às 6 variantes puras estabelecidas por SALAMAN. Isso tambem não é de extranhar, porque a analise dos nossos inoculos não foi levada ao mesmo ponto que nos estudos de SALAMAN. Entretanto, comparando cuidadosamente as reações consideradas tipicas por SALAMAN para as 6 variantes "puras" do virus X, em diferentes plantas hospedeiras, com as reações provocadas nas mesmas especies pelos nossos inoculos do virus X, chegamos a uma certa classificação desses inoculos, que especificamos na tabela a seguir:

TABELA 5

Comparação dos inoculos com as variantes do virus X diferenciadas por SALAMAN

Nome do inoculo do virus X	Designações correspondentes das variantes conforme SALAMAN
Ca. 193 A_5	X^S com um pouco de X^L
Ca. 53/1	X^S com um pouco de X^L
"Maj."	X^S com X^L
Eig. 1223	X^S com X^L
St. T.	X^L com X^S
Eig. O. S.	X^L com X^S
Ind. 401	X^L com um pouco de X^S
"Eerst."	X^L com muito pouco de X^S

Depreende-se desta tabela que, na suposição de que a classificação proposta por SALAMAN corresponda à realidade, todos os inoculos constituem misturas das duas variantes do virus X, chamadas pelo citado autor X^L ("medium strain") e X^S ("severe strain"); predomina, porem, em cinco dos inoculos, a variante mais forte, e em quatro, a mais fraca. Torna-se logo evidente a ideia de que nenhum dos nossos inoculos seja, no sentido de SALAMAN, perfeitamente puro. Se esses cinco inoculos fortes fossem identicos à variante X^S de SALAMAN, todos deviam produzir fortes necroses locais em *S. nodiflorum* e provocar manchas necroticas coalescentes, em *Capsicum annuum*, que chegariam a matar a folha inoculada. Entretanto os sintomas causados em *Capsicum* sp. pelos inoculos Ca. 193 A_5, Ca. 53/1 e em *S. nodiflorum* pelos inoculos Eig. 1223 e "Maj." foram relativamente brandos. Devido ao fáto de concordarem satisfatoriamente os sintomas produzidos em outras plantas hospedeiras pelos cinco inoculos mencionados, com os indicados por SALAMAN para a variante X^S do virus X, admitimos que os inoculos em questão contêm principalmente esta variante, associada, porem, em menores ou maiores quantidades, à variante X^L.

Por outro lado, para corresponder perfeitamente à variante X^L de SALAMAN, os nossos quatro inoculos fracos não deviam causar sintomas em *S. lycopersicum* ou produzir sintomas necroticos em *N. tabacum* var. White Burley. Entretanto, por serem as reações destes inoculos em outras plantas hospedeiras identicas às descritas por SALAMAN para a variante X^L, admitimos para eles uma associação de pequenas quantidades da variante X^S à variante X^L.

Poder-se-ia objetar que a nossa identificação é erronea, porque não verificámos a reação dos inoculos em certas especies que foram

estudadas por SALAMAN, e porque usámos para as inoculações outras variedades de tomate e material não determinado de *Capsicum*. Por outro lado realizámos tambem, em larga escala, inoculações em plantas de *N. rustica*, especie que não tinha sido utilizada por SALAMAN. Apezar disso, acreditamos que a identificação que propuzemos, dos nossos inoculos, com as variantes de SALAMAN, esteja certa, por se basear em numero bastante grande de plantas hospedeiras e por corresponder bem ao carater geral dos citados inoculos. Podemos, pois, resumir esta comparação entre os nossos resultados e as observações de SALAMAN, constatando que estamos em face de misturas de duas variantes do virus X, misturas essas que podem ser classificadas em dois grupos: o primeiro incluindo misturas em que predomina a variante X^S e o segundo abrangendo outras misturas em que predomina a variante X^L.

Feita assim a comparação dos nossos inoculos com as variantes distinguidas por SALAMAN (18), resta ainda expor se podemos tambem identificar esses inoculos com os grupos do virus X estabelecidos por KÖHLER. Visto que KÖHLER distingue os grupos principais do virus X na base das diferenças que estes grupos apresentam a respeito de sua tolerancia a temperaturas elevadas "in vitro", teriamos que realizar experiencias mais detalhadas sobre esta propriedade fisica dos virus dos nossos inoculos antes de inclui-los em um dos grupos estabelecidos por KÖHLER.

Se nos limitarmos, porem, exclusivamente, a uma comparação dos sintomas produzidos, podemos dizer que o grupo "necrotico" dos nossos inoculos corresponde, provavelmente, mais ou menos, às variantes do grupo C^S de KÖHLER e o grupo mais "clorotico", às do grupo Ers. do mesmo autor (12, pag. 68).

Como consideração final, devemos ainda mencionar aqui uma qualidade em que os nossos inoculos se distinguem nitidamente, seja das variantes de SALAMAN, seja das de KÖHLER. Ao passo que SALAMAN conseguiu ainda resultados positivos de inoculações friccionando as folhas das plantas experimentais com diluições de 1:10.000 de sucos de plantas doentes, e KÖHLER usa frequentemente com sucesso até diluições de 1:100.000 do suco original, as nossas inoculações, já com suco diluido apenas 1.000 vezes, não deram resultados positivos, a não ser em alguns casos. Ainda não averiguámos se esse insucesso, nas inoculações com suco diluido, se deve a peculiaridades do nosso método de inoculação, às condições externas do ambiente, ou ao estado de desenvolvimento das nossas plantas experimentais. Não acreditamos,

em todo caso, poder atribuir esse insucesso a uma diferença entre as nossas amostras e as descritas por SALAMAN e KÖHLER.

VERGLEICHENDE UNTERSUNCHUNGEN ÜBER VERSCHIEDENE HERKÜNFTE DES X-VIRUS DER KARTOFFELN AUS DEM STAAT SÃO PAULO

Zusammenfassung

1) In der vorliegenden Arbeit wurden 7 verschiedene Herkünfte des Kartoffelvirus X, die sämtlich aus dem Staate São Paulo stammen, mit je einer amerikanischen und einer holländischen Herkunft des gleichen Virus verglichen.

2) Jede der 9 Herkünfte wurde in zahlreichen vergleichenden Versuchsreihen zur Infektion gesunder Pflanzen von Nicotiana rustica, Datura stramonium, Nicotiana tabacum Varietät White Burley und von 7 weiteren Arten von Wirtspflanzen herangezogen. Die Resultate dieser Infektionsversuche, die aus vielen Einzelbeobachtungen ermittelt wurden, sind in unseren Tabellen 1 und 2 niedergelegt. Aus der Beobachtung der Symptome an zahlreichen Wirtspflanzen, und aus der Fähigkeit unserer Virusherkünfte Infektionen auf der gegen Kartoffel-Y-virus resistenten Wirtspflanze Datura stramonium hervorzurufen, von welcher das Virus ungeschwächt wieder auf Tabak übertragen werden konnte, wurde der Schluss gezogen, das unsere 9 Herkünfte Abarten des X-Virus der Kartoffeln darstellen, die nicht durch andere Virusarten verunreinigt sind.

3) In besonders ausgiebigem Masse wurden von uns Infektionsversuche an der Wirtsart Nicotiana rustica ausgeführt, die weder von KÖHLER *noch von* SALAMAN *zu derartigen Untersuchungen verwendet wurde, die sich aber bei unseren Versuchen als von grossem diagnostischem Wert erwies.*

4) Um die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den 9 Virusherkünften klar zu stellen, wurde zunächst versucht, den Einfluss der Variation des Versuchsmateriales und der äusseren Bedingungen einzuschätzen (Tabelle 4). Nach Ausschaltung dieser Fehlerquellen liess sich feststellen, dass die Unterschiede zwischen einigen unserer Virusherkünfte konstant sind und nicht durch umkehrbare modifikatorische Schwankungen erklärt werden können.

5) Unter Zugrundelegung der von SALAMAN *vorgeschlagenen Einteilung der Typen des Kartoffel-X-virus in 6 Varianten (Stämme) können wir unsere 9 Virusherkünfte in 2 Gruppen gliedern. Jede*

einzelne unserer Virusherkünfte würde hiernach ein konstantes Gemisch aus den zwei nämlichen Stämmen des Virus X darstellen, wobei aber das Verhältnis zwischen den beiden Bestandteilen von Herkunft zu Herkunft verschieden sei. Vorherrschend dürfte in der Gruppe, die "starke" Virusvarianten umschliesst, der Stamm Virus X^S sein, während die 2. Gruppe Herkünfte umfasst, in der der Stamm Virus X^L besonders zur Geltung kommt.

BIBLIOGRAFIA

1 — Böhme, A. W. — 1933 — Vergleichende Untersuchungen mit Stämmen des "X" und "Y" Virus. *Phytopath. Zsch.* 6, 517-524.

2 — Johnson, J. — 1925 — Transmission of viruses from apparently healthy potatoes. *Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 63.

3 — Johnson, J. — 1929 — The classification of certain virus diseases of the potato. *Wis. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 87.

4 — Koch, K. L. — 1933 — The nature of potato rugose-mosaic. *Phytopath.* 23, 319-342.

5 — Köhler, E. — 1933 — Untersuchungen über die Viruskrankheiten der Kartoffel, I. *Phytopath. Zsch.* 5, 567-591.

6 — Köhler, E. — 1934 — Untersuchungen über die Viruskrankheiten der Kartoffel, III, Weitere Versuche mit Viren aus der Mosaikgruppe. *Phytopath. Zsch.* 7, 1-30.

7 — Köhler, E. — 1935 — Mischinfektionen mit verschiedenen Stämmen des Ringmosaikvirus (x-Virus-Gruppe) der Kartoffel, Untersuchungen über die Viruskrankheiten der Kartoffel, IV. Mitteilung. *Angewandte Botanik* 17, 60-74.

8 — Köhler, E. — 1935 — Zur Charakterisierung des Ringmosaikvirus (x-Virus) der Kartoffel. *Proc. Zesde International Botanisch Congres*, Amsterdam. 2, 197-198.

9 — Köhler, E. — 1935 — Über die Variabilität des Ringmosaikvirus der Kartoffel. *Naturwissensch.* 23, 828.

10 — Köhler, E. — 1937 — Fortgeführte Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen des X=Virus der Kartoffel (Ringmosaikvirus). *Phytop. Zsch.* 10, 31-41.

11 — Köhler, E. — 1937 — Über eine aüsserst labile Linie des x-Mosaikvirus der Kartoffel. *Phytop. Zsch.* 10, 467-479.

12 — Köhler, E. — 1939 — Über das Auftreten abweichender Varianten bei den Cs=Stämmen des Kartoffel=X=virus. *Archiv für Virusforschung*, 1, 46-69.

13 — Köhler, E. — 1939 — Über die X^E=Gruppe des Kartoffel X=Virus. *Zbl. f. Bakteriologie, Parasitenk. und Infektionskrh.*, II. Abt. Bd. 101, 29-40.

14 — Kunkel, L. O. — 1940 — Genetics of viruses pathogenic to plants. *Amer. Assoc. Adv. Sci.*, 12, 22-27.

15 — Price, W. C. — 1940 — Acquired immunity from plant virus diseases. *Quart. Rev. Bot*, 15, 338-361.

16 — Putnam, D. F. — 1937 — Comparative studies in potato virus diseases. *Canadian Jour. Res.* 15, 87-107.

17 — QUANJER, H. M. — 1913 — Die Nekrose des Phloems der Kartoffelpflanze, die Ursache der Blattrollkrankheit. *Meded. R. Hoog. Land. - Tuin-en Boschbouwsch.*, Wageningen, 6, 41-80.

18 — SALAMAN, R. N. — 1938 — The potato virus "X": Its strains and reactions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, Series B, Vol. 229, n.º 559, pp. 137-217.

19 — SMITH, K. M. — 1931 — On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group. *Proc. Roy. Soc. B.*, 109, 251-267.

20 — SMITH, K. M. — 1933 — Recent advances in the study of plant viruses, London. I. and A. Churchill Ltd., 423 pp.

21 — SMITH, K. M. — 1937 — A textbook of plant virus diseases, London. I. and A. Churchill Ltd., 615 pp.

22 — VAN DER MEER, J. H. H. — 1932 — A study of the virus from the apparently healthy potato variety "Green Mountain". *Zentralbl. Bakt. Parasitenk. u. Infekt.*, II. Abt. 87, 240-262.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 20

Fig. *A* — Folha de *Nicotiana tabacum* var. Samsun, com aneis necroticos, concentricos, brancos (A).

Fig. *B* — Folha de *N. tabacum* var. White Burley, com necroses de pontos, linhas e aneis irregulares (N).

Fig. *C* — Folha de *N. tabacum* var. Samsun, com esclarecimento necrotico das nervuras (En).

Fig. *D* — Folha de *N. tabacum* var. White Burley, com aneis necroticos, concentricos e necroses em zig-zag acompanhando as nervuras (A e N).

Estampa 21

Fig. *E* — Folha de *N. tabacum* var. White Burley, com placas e aneis cloroticos, de centro mais escuro (C).

Fig. *F* — Folha de *N. tabacum* var. White Burley, com mosqueado na ponta (m) e aneis cloroticos no centro (C).

Fig. *G* — Folha de *Datura stramonium*, com placas e circulos cloroticos (C).

Fig. *H* — Topo de uma planta de *Datura stramonium*, mostrando nas folhas novas faixas escuras ou "veinbanding" acompanhando as nervuras (V).

Estampa 22

Fig. *A* — Folha de tomateiro, *Solanum lycopersicum* var. Rei Umberto, inoculada com o inoculo-padrão "Maj.", apresentando placas necroticas pardas, limitadas por halos cloroticos, com centro pardo mais claro (N).

Fig. *B* — Folha de tomateiro, da mesma variedade, inoculada com o inoculo Eig. O. S., mostrando placas circulares, cloroticas e quatro pontos necroticos pardos (n, C).

Fig. *C* — Folha de *Capsicum* sp., inoculada com o inoculo Eig. O. S., com circulos e placas necroticas pardas, divididas pelas nervuras (N).

Fig. *D* — Folha de tomateiro, variedade anteriormente citada, inoculada com o inoculo-padrão "Eerst." com pequeno numero de placas circulares, pouco conspicuas e sem centro necrotico (m).

Fig. *E* — Folha de *Capsicum* sp. inoculada com o inoculo-padrão "Eerst." com poucas placas e circulos necroticos, limitados por halos cloroticos (n,c).

Fig. *F* — Folha de *Solanum nodiflorum*, inoculada com o inoculo Ca. 193 A_5, com circulos necroticos pardos, de ponto necrotico no centro (A).

Estampa 23

Fig. *A* — Folha de *N. tabacum*, var. White Burley, inoculada em 23-5-1939 com o inoculo Ca. 193 A_5, mostrando alguns aneis necroticos (a) e muitas placas circulares, cloroticas (C).

Fig. *B* — Folha de *N. tabacum*, var. White Burley, inoculada em 23-5-1939 com o inoculo-padrão "Maj." mostrando um numero elevado de aneis necroticos (A) e inumeras placas cloroticas (C).

Fig. *C* — Folha de *N. tabacum*, var. White Burley, inoculada em 23-5-1939 com o inoculo St.T., mostrando poucas placas cloroticas, circulares, sem centro necrotico (C).

Fig. *D* — Folha de *N. tabacum*, var. White Burley, inoculada em 23-5-1939 com o inoculo Eig. O. S., mostrando poucos aneis necroticos (a) e um maior numero de placas cloroticas (C).

Estampa 24

Fig. *E* — Folha de *N. tabacum*, var. White Burley, inoculada em 23-5-1939 com o inoculo-padrão "Eerst", mostrando algumas pequenas placas circulares, cloroticas, pouco conspicuas, sem centro necrotico diferenciado (m).

Fig. *F* — Folha media de uma planta de *N. rustica*, planta inoculada em 25-4-1939 com o inoculo Eig. O. S., mostrando pontos e manchas irregulares necroticas (N) e poucos circulos cloroticos (c):

Fig. *G* — Folha media de uma planta de *N. rustica*, inoculada em 25-5-1939 com o inoculo-padrão "Eerst", mostrando um mosqueado em forma de placas cloroticas, irregulares ou circulares, estas ultimas com centro escuro, não necrotico (C).

Estampa 25

Fig. *A* — Caixa de proteção contra insétos; tipo destinado à conservação de plantas mais altas (paredes de tela de arame).

Fig. *B* — Caixa de proteção contra insétos; tipo destinado à conservação de series de plantas pequenas (paredes de tela de arame).

Fig. *C* — Caixa de proteção contra insétos; tipo de modelo igual ao da fig. *B*, porem de menores dimensões e provido de porta lateral (parede de etamine).

———o———



A



B



C



D



E



F



G

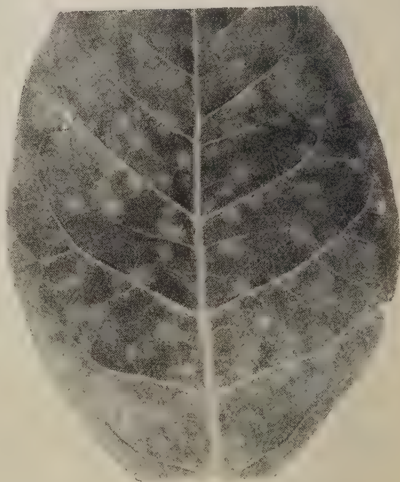


H


A
B
C
E
D
F



A



B



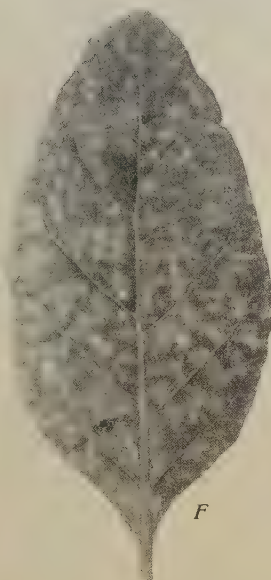
C



D



E



F



G



A



B



C

Vol. 12 — Art. 4 Outubro, 1941

NOVOS ASPÉTOS DO PROBLEMA DA FORMAÇÃO DOS CRISTAIS EM FOLHAS DE FUMO ATACADAS PELO MOSAICO [1]

POR

K. Silberschmidt e A. R. Campos

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 26-30

Como é sabido desde os trabalhos de B. GOLDSTEIN, (5) J. HENDERSON SMITH, (13) J. PH. CLINCH, (4) H. PURDY BEALE, (2) F. M. L. SHEFFIELD, (10) F. C. BAWDEN e F. M. L. SHEFFIELD (1) encontram-se em folhas atacadas pela doença mosaico do fumo dois tipos de inclusões: um é constituido pelos chamados corpos *X*, corpusculos de forma redonda ou ameboide, caracteristicos para muitas doenças de virus das plantas, e de frequente ocorrencia. O segundo, até agora só verificado em plantas atacadas por doenças do grupo do mosaico do fumo, consiste de cristais exagonais relativamente grandes, que após certos tratamentos microquimicos se transformam em agulhas.

Justamente devido ao grande tamanho dos referidos cristais, parece facil acompanhar o processo da sua formação. Nos trabalhos dedicados até agora a este assunto, e tambem num trabalho realizado em nosso laboratorio por K. SILBERSCHMIDT e J. C. CARVALHO (12), a formação dos cristais foi sempre estudada em pequenos pedaços de folhas destacadas da planta doente e montados entre lamina e laminula, sem nenhuma coloração ou fixação.

Seguindo esse metodo o pesquizador está sempre sujeito a cometer graves erros: ou observa a mesma preparação montada em agua distilada, durante dias sucessivos, fazendo assim as suas ultimas observações já em tecido morto ou pelo menos gravemente alterado em seu metabolismo, ou faz diariamente novas preparações, observando, neste caso, de fáto, celulas ativas, provenientes, porem, em cada preparação, de diferentes partes da folha doente. Deste modo, as observações sucessivas não podem representar a sequencia normal das varias fases do desenvolvimento dos cristais.

Para evitar nestas nossas pesquizas tais causas de erro, pareceu-nos desejavel elaborar uma técnica que permitisse a observação continua da formação das inclusões, na mesma região da folha e até

(1) Trabalho apresentado para o volume jubilar do Prof. ROCHA LIMA (Arq. Inst. Biol., Vol. 11, 1940).

nas mesmas celulas, em dias sucessivos. Mais valor teria ainda essa técnica se nela se pudese evitar a determinação de lesões nas folhas observadas.

TÉCNICA DE OBSERVAÇÃO

Acompanhamos neste trabalho o processo de formações de cristais em celulas de pêlos (trichomas) inseridos na margem de folhas de algumas Solanaceas. A dificuldade que se nos apresentava era focalizar sempre os mesmos pêlos durante varios dias de observação.

Afim de facilitar a observação continua dos mesmos pêlos, usámos então uma técnica que consistiu principalmente no emprego de uma camara humida na parte da folha a observar. Tal camara é constituida por três laminulas de vidro, redondas, dispostas de maneira a deixar entre duas delas um espaço destinado a receber a parte da folha. A construção se efetua da maneira que passamos a relatar. A primeira laminula é, por meio de uma pinça, levada a chama de gaz. Deve-se fazer que a pressão da extremidade da pinça seja sempre exercida no centro da laminula. Uma vez estando uma parte dos bordos da laminula em contáto com a chama, imprime-se á laminula um movimento giratorio lento. Esse movimento tem a vantagem de fazer que os bordos fiquem o mais uniformemente possivel voltados para baixo, de maneira que a laminula tome a forma de uma pequena concha. Para melhores detalhes ver a fig. *A* da estampa 26. Da segunda laminula destacamos, com uma pinça, um pequeno segmento. Em seguida colocamo-la sobre a primeira, colando-as ambas com o auxilio de uma resina, que é a mesma usada em laboratorio para as preparações microscopicas definitivas. Resulta assim uma pequena camara (Estampa 26, fig. *B*), com uma abertura constituida pela ausencia do segmento destacado da segunda laminula. A fig. *C* da estampa 26 representa uma vista de cima, desta parte da camara. A parte da camara até agora descrita serviu nas nossas experiencias apenas para fornecer um pouco dagua à folha em observação. Para completar finalmente a camara, colocamos a terceira laminula, tambem de forma redonda, mas de diametro um pouco maior, sobre a segunda, deixando contudo entre ambas o espaço suficiente para receber a parte do limbo da folha a ser observada. Esse afastamento entre a segunda e a terceira laminula consegue-se facilmente colocando algumas gotas da resina, fundida, entre elas. A fig. *D* mostra um corte transversal esquematico da camara completa.

Por essa figura podemos verificar que a camara completa compreende duas cavidades, sendo a inferior destinada a receber agua, e

a superior, formada pelo espaço deixado entre a segunda e a terceira, para adatar-se à folha em observação. Os bordos da segunda laminula foram colados aos bordos da terceira de maneira a deixar sempre, no lugar onde o segmento foi destacado, uma abertura por onde penetra a parte da folha, cujos pêlos se deseja observar. A camara assim formada é adatada à parte do bordo da folha escolhida como ponto de partida para o curso de nossas pesquizas. Essa adatação deverá ser processada com cuidado, afim de não lesar nenhum do pêlos a estudar.

Para evitar que a camara humida se destaque da folha, ela é ligada a esta por meio de uma tira de esparadrapo. A fig. *A* da estampa 29 demonstra a maneira de adatar a camara à folha. Antes das observações enchem-se ambas as cavidades com agua, por meio de uma pipeta capilar, como se vê na mesma figura. Assim a camara fica pronta para a serie de observações ao microscopio. Para a observação, põe-se a planta em posição tal, que a folha com a camara fique levemente repousada na platina do microscopio. Fazendo coincidir exatamente a camara com a abertura da platina, com muita facilidade se focalizam os pêlos a observar.

A principio, dado o tamanho das folhas em observação, o emprego de tais camaras era relativamente facil. Continuando porem a serie de nossas pesquizas, quizemos verificar a formação dos cristais em folhas muito novas de *Nicotiana tabacum*. Estas, que nunca mediam mais de três centimetros de comprimento, já não se adatavam à camaras até então por nós usadas. Para remover essa dificuldade, tivemos que adotar outro tipo de camara, que diferiu do primeiro apenas quanto ao tamanho das laminulas. Esse tipo de camara, construido da mesma maneira que o anterior, sem outra modificação senão o emprego de laminulas menores que as daquele, se adata facilmente às folhas de menores dimensões, e tem a grande vantagem de não vergar a folha para baixo.

Usando esta técnica, realizámos as primeiras observações das celulas dos pêlos no dia em que as folhas foram inoculadas com o mosaico do fumo. Na mesma ocasião foram sempre feitos desenhos detalhados de toda a area da região da folha a ser pesquizada (Fig. *E* da estampa 26). Nesse desenho, feito com o auxilio de uma ampliação relativamente fraca ao microscopio, foi dado um numero a cada pêlo, de sorte a torna-los facilmente reconheciveis nas observações subsequentes. Estas foram feitas com uma ampliação mais forte ao microscopio. Dos desenhos traçados do mesmo pêlo em dias sucessivos, foram tiradas fotografias que representam assim as diversas fases do desenvolvimento dos cristais (Figs. *A* e *B* da estampa 27, *A* da estampa 28, *A* e *B* da estampa 30).

TÉCNICA DE INOCULAÇÃO

No curso de nossas observações usámos para as inoculações o virus do mosaico comum do fumo. Este foi obtido de plantas de fumo infectadas artificialmente. A inoculação deu-se pelo processo de friccionamento das folhas por meio de um pouco de algodão preso à ponta de uma pinça.

DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

I) A FORMAÇÃO DOS CRISTAIS EM FOLHAS INSERIDAS NA PLANTA

Afim de tornar mais clara a maneira de como os nossos resultados foram obtidos, vamos relatar em seguida, em seus detalhes, uma serie de observações realizadas numa só folha, quanto à formação de cristais. Para isso escolhemos a experiencia efetuada entre os dias 23-7-1940 a 14-8-1940 com uma planta de *Nicotiana tabacum* var. Geudertheimer.

Essa planta foi inoculada em 23-7-1940 numa folha média, pelo processo já descrito, com o virus do mosaico do fumo. Logo depois da inoculação adatámos à folha inoculada uma camara humida, do tipo descrito anteriormente. Ainda no mesmo dia levámos a folha com a camara já ajustada, ao microscopio, e fizémos um desenho geral (vide fig. *E* da estampa 26) da parte da folha coberta pela camara. Já nessa primeira observação verificámos que um pêlo, ao qual demos o numero 7, prestava-se bem às observações, dada a nitidez do conteudo das suas celulas. A esse pêlo n.° 7, que sempre focalisámos nas observações sucessivas, se referem as figs. *a-i* da estampa 27 A. Damos a seguir as modificações constatadas no teôr das celulas desse pêlo durante todo o periodo da observação.

As figs. *a* e *b* mostram a aparencia das celulas nos 3.° e 4.° dias respetivamente, após a inoculação. Notámos nesses desenhos o teor celular no estado carateristico das celulas sadias. Em cada celula podemos verificar um nucleo de forma arredondada, plastidios, gotas de gordura e outros corpusculos que não ficam no mesmo lugar, mas são transportados para pontos diversos da celula pela circulação do protoplasma.

Modificações mais acentuadas foram verificadas 5 dias após a inoculação. Estas consistiam na aceleração nitida da corrente protoplásmica. As observações notadas no 8.° dia estão representadas na fig. *d*. Verifica-se nessa figura um aumento consideravel dos pequenos corpos, já mencionados acima e veiculados pela corrente protoplasmica. O numero elevado dos corpusculos anotados nas celulas pode-se ainda verificar nas observações feitas 13 dias depois da inoculação, (vide fig. *e*). Nesta ultima figura notamos que alguns corpusculos

têm dimensões um pouco maiores. Achamos bem possivel que essas inclusões maiores sejam formadas pela fusão de duas ou mais particulas, cuja ocorrencia já foi assinalada.

No 15.º dia depois da inoculação, isto é, a 7-8-1940, registrámos pela primeira vez o aparecimento de um reduzido numero de cristais no pêlo por nós observado. Como mostra a fig. *f*, os cristais apareceram primeiro só na celula basal do pêlo. Daí em diante (ver figs. *g*, *h* e *i*) notamos aumento, tanto do numero como do tamanho dos cristais, que, aliás, nestas ultimas observações, já apareceram em quasi todas as celulas do pêlo. Depois do vigesimo dia já não notámos modificações consideraveis no teôr das celulas em cristais. Em consequencia da corrente protoplasmica das celulas, os cristais mudam de lugar, conservando porem o mesmo numero e tamanho.

Como se verifica dessa descrição, o aparecimento dos cristais realizou-se de uma maneira mais ou menos subita, sem que seja possivel observar estados intermediarios da sua formação. As unica modificações das celulas que notámos nos dias anteriores ao aparecimento dos cristais, consistiram no aumento do numero das particulas de bordos irregulares contidas nas celulas. Admitimos por isso que exista estreita relação entre o aumento do numero desses corpusculos e a formação dos cristais. Provavelmente a formação de cada cristal é consequencia da junção de algumas dessas particulas. Devemos mencionar, no entanto, que o verdadeiro processo de junção dessas particulas não foi por nós observado.

Depois de descrever de uma maneira mais minuciosa os resultados de uma serie de observações, passaremos a relatar os resultados conseguidos em outros ensaios. As observações acima mencionadas se referem a uma folha média inoculada. Nosso proximo objeto consistiu em saber que modificações podemos observar em folhas mais velhas e situadas abaixo da folha inoculada. Nesse caso ajustámos a camara humida não à propria folha inoculada, mas numa folha inserida num nivel inferior da haste. Experiencias desse tipo foram executadas ao mesmo tempo que as referidas acima (23-7-1940 a 21-8-1940). Pudémos observar (Est. 27, *B*, *e*, *f*,), alguns dias após a inoculação, um ligeiro aumento no numero das particulas existentes na celula. Não pudémos porém absolutamente observar a formação de cristais nos pêlos dessa folha. Estados sucessivos do aspéto de um pêlo de uma folha velha são representados na fig. *B*, *a-j* da estampa 27.

De maior interesse ainda para nós é a maneira por que se realisa a formação dos cristais em folhas novas, pois é sabido, pelas

indicações da literatura, que justamente nessas folhas o virus se multiplica muito, e tambem que elas apresentam os sintomas mais nitidos da doença.

Na época em que realizámos as observações nas folhas médias e velhas, efetuámos tambem observações em folhas novas; estas observações porem não deram resultados satisfatorios, porque o nosso modelo comum de camara humida era pesado demais para as folhas novas delgadas e por isso prejudicava o desenvolvimento delas. Queremos pois relatar aqui experiencias feitas um pouco mais tarde com o auxilio da camara menor e mais leve, (descrita pag. 61), que se podia ajustar sem prejuizo para o tecido das folhas mais novas do fumo.

As observações feitas em tais folhas deram, em diferentes ensaios, resultados identicos entre si, mas não imediatamente comparaveis com os das observações em folhas velhas e médias. As observações em folhas novas, não só foram feitas em época diferente, mas tambem em outro lugar da folha. Enquanto, nos primeiros ensaios, adatámos a camara sempre na extremidade da folha, nestas ultimas series de experiencias as camaras foram postas na parte média delas. Mencionamos isso porque achamos bem possivel que a formação dos cristais se realize com diferente ritmo nas diversas zonas da folha, e em varias épocas do ano. Mesmo assim acreditamos que as diferenças dos resultados determinadas pela idade das folhas são maiores do que as causadas pelos outros fatores.

Quanto às observações realizadas em folhas novas, tais estudos foram realizados entre os dias 2-9-1940 e 19-9-1940. Escolhemos para estes ensaios 4 plantas, das quais uma folha recebeu a camara humida, de cada vez. O processo de formação dos cristais numa destas 4 folhas é representado nas figuras *A* (*a-i*) da estampa 28.

Como carater principal do processo da formação dos cristais nessas folhas novas, pode-se constatar uma intensificação do processo da formação das inclusões. Pudémos observar aqui, já a partir do 6.º dia, o aumento do numero das particulas (Fig. *d*) e o aparecimento de verdadeiros cristais, a partir do 8.º dia, (vide fig. *e*), ao passo que na folha média tinhamos observado os mesmos fenomenos apenas no 8.º e 15.º dia, respetivamente (fig. *A* da estampa 27).

II) A FORMAÇÃO DE CRISTAIS EM FOLHAS DESTACADAS DA PLANTA

Depois de ter observado o processo da formação dos cristais em folhas ainda inseridas na planta, achámos de interesse acompanhar a formação de cristais em folhas que logo após a inoculação tinham sido destacadas da planta. Estudos desse tipo podem fornecer elementos muito valiosos para o esclarecimento da natureza dessas inclusões.

Esperavamos, desta maneira, elaborar métodos que permitissem acelerar ou retardar o processo da formação das inclusões. Tal alteração no ritmo da formação dos cristais pode-se provocar mediante modificações das condições externas, as quais podem ser mais facilmente aplicadas a folhas destacadas do que a plantas inteiras. Diferentes autores já verificaram que o virus aumenta tambem em orgãos destacados da planta. Mencionamos aqui o trabalho de CALDWELL, (3) que observou a formação de necroses locais em folhas de *Nicotiana glutinosa,* que após a inoculação com o mosaico do fumo tinham sido destacadas da planta e guardadas em placas de Petri com areia humida. Um trabalho recente sobre modificações do metabolismo em folhas inoculadas com o mosaico do fumo e depois destacadas da planta, foi publicado por TAKAHASHI (15). Observações citologicas sobre o aparecimento de inclusões em celulas de folhas de fumo destacadas da planta, foram publicadas por SHEFFIELD (10).

Nestes ensaios fizémos uso de um metodo um pouco diferente do empregado por outros autores.

Numa das extremidades de uma lamina de vidro de 23 centimetros de comprimento por 9 de largura (vide figs. *B* e *C* da estampa 29), colámos uma pequena placa de Petri, que serviu para receber a base da folha a ser observada. Essa placa de Petri foi coberta por uma tampa de vidro, tendo uma abertura suficiente para permitir a entrada do peciolo da folha. Durante o curso das experiencias, essas caixas foram cheias da solução nutritiva de v.d. CRONE [1]. Diariamente a solução foi renovada. A observação continua da formação de cristais em tais folhas destacadas torna-se mais facil do que em folhas inseridas na planta. Basta para isso apoiar a ponta da folha sobre a lamina de vidro e cobri-la por meio de uma laminula, tendo os dois bordos laterais (vêr figs. *B* e *C* da estampa 29), colados sobre a placa de vidro. Usámos para isso a mesma resina empregada na confecção das camaras humidas já referidas. Os resultados obtidos com folhas destacadas são muito semelhantes aos obtidos com as folhas ainda inseridas na planta. Nas figuras *A* e *B* da estampa 30 damos dois exemplos do processo da formação dos cristais em pêlos de folhas destacadas da planta. Podemos vêr nessas figuras que o destaque da folha não impediu o processo de formação das inclusões. Ao contrario, esse processo realizou-se da mesma maneira que nas experiencias anteriormente referidas. Pudémos até verificar que, em folhas destacadas, o processo da formação dos cristais leva menos tempo do que em folhas ainda inseridas na planta.

---

(1) A solução original foi, antes de usar, diluida com agua distilada, na proporção de 1:1. O P_H da solução foi determinado, tendo o valor 4,66.

Nos doze pêlos que tinhamos em observação entre 2-9-1940 e 15-9-1940 notámos o aparecimento dos primeiros cristais sempre no 6.º dia após a inoculação. Esse resultado mostra que justamente nessas folhas o processo de formação dos cristais se realiza com grande precisão.

A figura *C* da estampa 28 ilustra a ocorrencia de cristais em pêlos de uma folha destacada no 9.º dia após a inoculação. A figura *B* da estampa 28 mostra a ausencia de cristais em pêlos de uma folha destacada que tinha sido friccionada com agua distilada.

O curto intervalo em que se registra, nas folhas isoladas, o aparecimento dos cristais, pode-se explicar talvez pelo fáto de ficar o virus, nessas folhas, limitado a um só orgão, ao passo que nas experiencias anteriores a maior parte do agente infeccioso passa a outras partes da planta. Em todo o caso, não pode haver duvida a respeito da formação mais rapida de cristais nos pêlos de folhas destacadas. No entanto, pudémos notar que nessas condições os cristais se formam em menor numero. Tambem esse resultado pode-se explicar facilmente pelas condições especiais a que essas folhas estão submetidas. E' bem compreensivel que em folhas, cuja ligação com a planta-mãe foi interrompida, pode haver certa ausencia de produtos do metabolismo, que de acordo com a opinião de varios autores, entram na composição dessas inclusões. Em todo caso, pudémos verificar a referida diminuição no numero dos cristais formados nas celulas, em todos os pêlos por nós pesquizados.

O resultado citado, referente a folhas destacadas de *Nicotiana tabacum* var. Geudertheimer, foi confirmado em ensaios complementares para folhas destacadas de *N. tabacum* var. Samsun. Tambem nos pêlos das folhas dessa variedade apareceu um numero relativamente pequeno de cristais, mas esses já foram observados 6 dias após a inoculação.

III) RELAÇÃO ENTRE O APARECIMENTO DOS SINTOMAS MACROSCOPICOS E A FORMAÇÃO DOS CRISTAIS

Até agora falámos apenas das observações microscopicas efetuadas nas folhas doentes, sem nos referir aos sintomas macroscopicos que as mesmas folhas apresentaram.

Podemos afirmar aqui a existencia de certa relação entre o aparecimento de cristais e a ocorrencia dos sintomas macroscopicos nas folhas estudadas. Mencionámos acima que, nas folhas velhas e inseridas na planta no nivel inferior ao da folha inoculada, nunca nos foi possivel observar a formação de cristais. As mesmas folhas tambem deixaram de apresentar qualquer sintôma macroscopico de doença.

Passando agora à descrição dos sintomas observados nas folhas novas, pudémos verificar que nas quatro folhas novas e ainda inseridas na planta, os cristais se formaram quasi ao mesmo tempo em que os sintomas externos de doenças se tornaram visiveis. Em duas dessas folhas verificámos o aparecimento dos primeiros sintômas, os quais consistiam num ligeiro esclarecimento das nervuras e num mosqueado da parte basal da folha, já no 7.° dia após a inoculação, isto é, no mesmo dia em que os cristais foram assinalados. Nas duas ultimas folhas observámos ligeiros sinais de doença já um dia antes da constatação da formação dos cristais. Uma excepção muito interessante desse paralelismo entre o aparecimento dos sintomas e a formação dos cristais, constitue o caso das folhas destacadas: nestas, como antes foi mencionado, verificámos com muita nitidez a formação dos cristais, ao passo que não foi possivel a observação de nenhum sintoma macroscopico.

Esse resultado é interessante por existirem na literatura referencias à ausencia de inclusões em plantas em que o virus existe em forma latente *(carrier)*. As nossas observações a respeito das folhas destacadas poderiam pois demonstrar que mesmo folhas sem sinais de doença podem conter inclusões celulares.

DISCUSSÃO

O processo da formação de cristais em celulas de plantas infetadas com o mosaico do fumo já foi estudado por varios autores. Entretanto os resultados de todos esses trabalhos não são imediatamente comparaveis com as nossas observações, pois até agora não foi acompanhado o processo de desenvolvimento dos cristais em folhas ainda inseridas na planta.

A maioria dos autores (2, 5, 8, 12) cortou das folhas doentes um pedaço para cada observação, de maneira que os varios estados da formação dos cristais foram pesquizados em diferentes partes de uma folha doente. E' claro que, desse modo, nunca se pode afirmar que os estados observados representam verdadeiramente a sequencia normal das diferentes fases da formação dos cristais. Sentindo essa falta, F. M. L. SHEFFIELD (10, 1931) empregou um novo método de observação: destacou de uma planta infetada uma folha cujo peciolo foi colocado em solução nutritiva. O limbo dessa folha, convenientemente coberto por uma laminula, serviu para as observações sucessivas. Devido ao fáto de se conservar dessa arte viva a folha, durante alguns dias, foi possivel efetuar varias observações nessa mesma folha. Apezar dessa técnica de observações lembrar mais o processo empre-

gado por nós, tambem nesse caso os resultados conseguidos por SHEFFIELD (10) e por nós, não podem ser imediatamente comparados, pelas razões seguintes.

As nossas observações se referem, em grande parte, a folhas cujo contáto normal com a planta não foi de nenhum modo interrompido. Todas as pesquizas de SHEFFIELD, porem, se realizaram com folhas destacadas da planta. Não sabemos, tambem, se SHEFFIELD conseguiu realizar as observações sucessivas sempre nas mesmas celulas da folha doente, ao passo que o tipo de camara usado nos nossos estudos nos auxiliou a localizar, de fáto, os mesmos pêlos nas diferentes observações.

A ultima diferença existente entre as mencionadas pesquizas de SHEFFIELD e as nossas verificações, reside no fáto de ter ela trabalhado com o virus do "mosaico-aucuba" do fumo, enquanto nós empregamos o virus do "mosaico comum" do fumo. Diante dessas diferenças na técnica da execução entre os trabalhos anteriores e os estudos atuais, não podemos esperar uma perfeita analogia a respeito dos resultados conseguidos. Vamos passar agora a relatar, em poucas palavras, em que pontos se manifestaram diferenças entre os resultados.

Focalizando em primeiro lugar a questão relativa ao prazo decorrido entre a inoculação e a verificação dos cristais, deve-se antes de tudo mencionar que, no curso de suas pesquizas, SHEFFIELD mudou de opinião a respeito disso. No seu trabalho publicado em 1931, essa pesquizadora encontrou os cristais do tipo por nós pesquizado, sómente muitas semanas depois da inoculação das plantas. Esses cristais foram então considerados como produtos da desintegração dos corpos X.

Num trabalho mais recente, porem, publicado em colaboração com F. C. BAWDEN (1), os autores chegaram à conclusão de que os cristais em questão se formam em grande numero, logo depois da inoculação. "As primeiras alterações microscopicas", — dizem os autores (p. 107) — "podem ser observadas em plantas que se acham em condições favoraveis ao crescimento, mais ou menos uma semana após a inoculação". Com isso confirmam as observações anteriores de RAWLINS e JOHNSON (8). Estes autores, já em 1925, tinham verificado o aparecimento dos cristais em folhas entre o 6.° e o 8.° dia após a inoculação.

Essas indicações coincidem satisfatoriamente com o resultado das nossas observações, pois constatámos, em folhas destacadas das plantas doentes, o aparecimento dos primeiros cristais sempre no sexto dia após a inoculação. Em folhas ainda inseridas na planta, o processo de formação dos cristais leva algum tempo mais, provavelmente devido

ao fáto de que, neste caso, o virus formado na folha não fica acumulado nela, mas passa, em grande parte, a outros orgãos.

Assim, se as nossas averiguações e as observações de BAWDEN e SHEFFIELD e outros autores chegaram ao mesmo resultado a respeito do tempo necessario para a formação dos cristais, verificam-se por outro lado diferenças nitidas, ao comparar as indicações referentes ao proprio processo de formação dos cristais. Não pudemos confirmar, por exemplo, até agora, por observações proprias, as constatações de BAWDEN e SHEFFIELD (p. 106), segundo as quais os varios cristais contidos numa celula nova, mais tarde coalescem formando uma só massa quasi amorfa. Ao contrario, baseados nas nossas observações, queremos admitir que os cristais, uma vez formados, possuem certa estabilidade. BAWDEN e SHEFFIELD (p. 107), porem, além de supôr essa possibilidade da fusão de varios cristais em uma só massa, acreditam tambem no desaparecimento dos cristais em celulas velhas, considerando isso como fase final do desenvolvimento dos cristais. Em outro trabalho SHEFFIELD (11, 1939) considerou tambem os cristais como de estrutura extremamente labil, ao passo que nós, ainda em celulas mortas, observámos às vezes cristais sem alterações apreciaveis. Devemos mencionar, finalmente, que o tipo de cristal em forma de espiga, descrita por SHEFFIELD (1931), nunca foi por nós observado.

Depois de comparar desta maneira, com as indicações da literatura, as nossas observações referentes ao tempo necessario e à sequencia das varias fases na formação dos cristais, consideraremos agora, da mesma forma, as relações existentes entre a formação dos cristais e o aparecimento dos sintomas.

E' sabido desde os estudos de STANLEY (14) e BEALE (2), que amostras fracas do virus do mosaico, deixando de produzir sintômas nitidos nas plantas hospedeiras, tambem não estimulam a produção de cristais. De acôrdo com as observações de RAWLINS e JOHNSON (8) uma diminuição do teôr das celulas em cristais verifica-se tambem nas celulas de plantas doentes que se desenvolvem em condições de temperatura desfavoraveis ao aparecimento dos sintomas. Completando essas observações, SILBERSCHMIDT e CARVALHO (12) verificaram que o "mosaico comum" do fumo tambem não provoca a formação de cristais em plantas hospedeiras em que o virus fica numa forma latente. Baseados nesses resultados, BAWDEN e SHEFFIELD (1) aventaram a hipotese de que o aparecimento dos sintômas e a formação das inclusões dependem do mesmo fatôr, isto é, da formação de certos produtos na planta, devido ao metabolismo alterado das celulas doentes. Segundo essa teoria, os sintomas externos da doença nas folhas nada mais

são do que indices da ocorrencia de tais produtos do metabolismo alterado, produtos que são ao mesmo tempo componentes indispensaveis das inclusões intracelulares. Pode-se concluir dessa ideia, que as inclusões só se podem formar em folhas que já contenham os produtos do metabolismo alterado, isto é, em folhas que provavelmente já apresentem sintomas da doença.

De fáto, estão de acordo com esta ideia as nossas observações referentes à formação de cristais em folhas ainda inseridas na planta viva. Nas folhas velhas não pudemos notar absolutamente sintômas de doença, nem siquer nos foi possivel verificar nelas a ocorrencia de cristais. Nas folhas novas constataram-se os primeiros sinais macroscopicos de doença entre o setimo e oitavo dia após a inoculação, e o aparecimento dos cristais foi observado no mesmo dia, ou no imediato ao do aparecimento dos sintomas. Na folha média, a manifestação de sintômas levou mais tempo, e tambem as inclusões em forma de cristais só se tornavam visiveis, nesta folha, no 15.° dia após a inoculação. Em todo caso, nos exemplos resumidos aqui, os cristais apareceram ao mesmo tempo que os sintômas macroscopicos, ou, pelo menos, imediatamente depois.

Discordam porém plenamente desses resultados as observações feitas nas folhas destacadas da planta, onde, como acima frizámos, o aparecimento dos cristais se dá a partir do 6.° dia. Sintomas macroscopicos da doença, porem, não puderam ser verificados nestas folhas até o fim das observações, isto é, pelo menos até o 20.° dia após a inoculação. Parece portanto que, neste caso, não há uma correlação tão intima entre o aparecimento dos sintomas e a ocorrencia das inclusões, o que nos leva a admitir que a teoria formulada por BAWDEN e SHEFFIELD não se adata a todos os casos de formação de inclusões.

Até agora, apenas expuzemos essa teoria de BAWDEN e SHEFFIELD na parte tocante às relações existentes entre o aparecimento dos sintomas e a ocorrencia de inclusões. Esses autores, porém, manifestaram tambem idéias interessantes a respeito da natureza dos cristais. Vejamos se as nossas observações contribuem para confirmar essas idéias.

Os citados autores acham que a formação de cristais, justamente em folhas novas, se deve ao fáto dessas folhas possuirem, apezar de uma baixa concentração em virus, um baixo gráo de acidez e um teôr pouco apreciavel em sais minerais. Dessa maneira, consideram quasi como sendo inversa a correlação entre a concentração das celulas em virus, e o aparecimento das inclusões.

Não podemos acreditar porém, que as indicações da literatura e as nossas observações confirmem, em todos os pontos, essa ideia. Desde os trabalhos de H. H. MC KINNEY (7) e de G. SAMUEL (9)

sabemos que o virus do mosaico do fumo passa rapidamente da folha inoculada para as pontas de vegetação e as folhas novas, onde se multiplica intensamente. Achamos, por isso, que a concentração de virus, justamente nas folhas novas, deve ser mais elevada do que nas mais idosas. Tambem uma observação nossa nos leva a acreditar que a correlação entre o aparecimento das inclusões e a concentração do virus é antes diréta que inversa. E' que observámos, nas nossas experiencias, que o numero dos cristais formados em folhas ainda inseridas na planta é maior que o correspondente em folhas destacadas.

Acreditamos que nessas folhas destacadas, em virtude de não se acharem em condições de crescimento iguais às inseridas na planta, a multiplicação do virus não pode alcançar o mesmo valor que nestas ultimas. Isso mostraria a existencia de uma correlação diréta entre a concentração de virus e o numero dos cristais formados.

BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE BILDUNG KRISTALLFÖRMIGER EINSCHLUSSKÖRPEN IN DEN BLÄTTERN MOSAIKKRANKER TABAKSPFLANZEN

Zusammenfassung

1) — *Die Bildung von Einschlusskörpern in Form von Kristallplättchen in den Zellen mosaikkranker Pflanzen wurde in den bisherigen Veröffentlichungen in der Regel an Hand von Präparaten festgestellt, die aus abgetrennten Stückchen des Blattrandes kranker Blätter bestanden.*

2) — *In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, die eine fortlaufende Beobachtung der gleichen Zellen am lebenden Blatt, dessen Zusammenhang mit der Pflanze keine Unterbrechung erfährt, gestattet.*

3) — *Diese Methode besteht im Wesentlichen in der Anbringung einer kleinen Glaskammer an der zur Beobachtung ausgewählten Zone des Blattes. Die Glaskammer dient dem Zweck, die vom Blattrand abstehenden Haare zu schützen und den Beobachter instand zu setzen, bei den aufeinanderfolgenden mikroskopischen Beobachtungen stets wieder die gleichen Haarzellen aufzufinden.*

4) — *Solche Glaskammern lassen sich leicht mit Hilfe von 3 runden Deckgläschen herstellen, die mit Hilfe eines Kittes verbunden werden, wie er zur Verfertigung von Dauerpräparaten verwendet wird. Verschiedene Stadien der Fabrikation der Glaskammer sind in den Figuren* A-D *der Tafel 26 schematisch wiedergegeben, die Art der Anbringung der Kammer an das lebende Blatt zeigt Abb.* A *der Tafel 29.*

5) — *Nach Anbringung der Glaskammer an das Blatt wird bei schwacher Vergrösserung eine Übersichtszeichnung der zur Beobachtung bestimmten Zone des Blattes hergestellt (Fig.* E *der Tafel 26). Auf dieser Zeichnung wird jedem Haar eine besondere Nummer zugewiesen um die spätere Orientierung zu erleichtern.*

6) — *Bei den späteren jeweils in Tagesabständen vorgenommenen Beobachtungen wurden die Zellen stets des gleichen Haares bei starker Vergrösserung beobachtet, wobei alle auftretenden Veränderungen des Zellinhaltes sorgfältig aufgezeichnet wurden.*

7) — *Jede unserer Figuren No* A *und* B *der Tafel 27,* A *der Tafel 28 und* A *und* B *der Tafel 30 stellt die photographische Wiedergabe von Zeichnungen dar, die von den Zellen je eines Haares an verschiedenen Beobachtungstagen angefertigt wurden.*

8) — *Am ersten Beobachtungstag wurde unsere Versuchspflanze (N i c o t i a n a t a b a c u m, var. Geudertheimer) stets durch Safteinreibung mit dem Tabakmosaikvirus infiziert. Das Auftreten der ersten Kristalle wurde in den Haarzellen j u n g e r Blätter schon am 8. auf die Ausführung der Infektion folgenden Tag festgestellt, während bei Blättern m i t t l e r e n Alters eine etwas längere Zeitspanne (15 Tage) zur Ausbildung der kristallförmigen Einschlusskörper benötigt wurde (Fig.* A *der Tafel 27 und Fig.* A *der Tafel 28). Bei alten Blättern konnte niemals die Ausbildung kristallförmiger Einschlusskörper beobachtet werden. (Fig.* B *der Tafel 27).*

9) — *Die Beobachtungen an Blättern, deren Zusammenhang mit der Pflanze erhalten blieb, wurden ergänzt durch Beobachtungen an Blättern, die nach Infektion der Pflanze von dieser abgetrennt wurden. Diese Blätter wurden mit dem Stiel in Nährlösung getaucht und konnten auf diese Weise mehrere Wochen lang am Leben erhalten werden. (Fig.* B *und* C *der Tafel 29).*

10) — *In den Haarzellen solcher von der Pflanze abgetrennter Blätter lässt sich das Auftreten von Kristallen schon am 6. Tag nach Ausführung der Infektionen beobachten (Fig.* A *und* B *der Tafel 30).*

11) — *Die Art der kristallförmigen Einschlusskörper lässt sich aus Fig.* C *der Tafel 28 entnehmen, die eine Mikrofotografie der Haarzellen eines mosaikkranken Tabaksblattes am 9. Beobachtungstag darstellt. Zum Vergleich dient Fig.* B *der Tafel 28, die entsprechende Haarzellen eines gesunden Blattes wiedergibt.*

BIBLIOGRAFIA

1 — BAWDEN, F. C. and F. M. L. SHEFFIELD — 1939 — The intracellular inclusions of some plant virus diseases. *Ann. App. Biol.* 26, 102-115.

2 — BEALE, H. P. — 1937 — Relation of Stanley's crystalline tobacco virus protein to intracellular crystalline deposits. *Contrib. from Boyce Thompson Institute* 8, 413-431.

3 — CALDWELL, J. — 1932 — Studies in the physiology of virus diseases in plants. III. Aucuba or yellow mosaic of tomato in Nicotiana glutinosa and other hosts. *Ann. App. Biol.* 19, 144-152.

4 — CLINCH, J. PH. — 1932 — Cytological studies of potato plants affected with certain virus diseases. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 20, 143-172.

5 — GOLDSTEIN, B. — 1926 — A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. *Bull. of the Torrey Bot. Club*, 53, 499-599.

6 — HOGGAN, I. A. — 1927 — Cytological studies on virus diseases of Solanaceous plants. *Journal Agric. Research.* 35, 651-671.

7 — MC KINNEY, H. H. — 1927 — Quantitative and Purification methods in virus studies. *Journal Agric. Research* 35, 13-38.

8 — RAWLINS, T. E. and J. JOHNSON — 1925 — Cytological studies of the mosaic disease of tobacco. *Amer. Journal of Botany* 12, 19-32.

9 — SAMUEL, G. — 1934 — The movement of tobacco virus within the plant. *Ann. Appl. Biology* 21, 90-111.

10 — SHEFFIELD, F. M. L. — 1931 — The formation of intracellular inclusions in Solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. *Ann. Appl. Biology* 18, 471-473.

11 — SHEFFIELD, F. M. L. — 1939 — Micrurgical studies on virus-infected plants. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 126, 529-538.

12 — SILBERSCHMIDT, K. e J. C. CARVALHO — 1938 — Observações citologicas sobre o mosaico do fumo. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo 9, 261-271.

13 — SMITH, J. H. — 1930 — Intracellular inclusions in mosaic of Solanum nodiflorum. *Ann. Appl. Biology* 17, 213-222.

14 — STANLEY, W. M. — 1936 — Chemical studies on the virus of tobacco mosaic VI. The isolation from diseased turkish tobacco of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 26, 305-320.

15 — TAKAHASHI, W. N. — 1940 — The increase of tobacco-mosaic virus and the changes accompanying nitrogen compounds in detached tobacco leaves. *Phyt.* 30, 790.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 26

Figs. *A-D* — Diferentes estados da confecção da camara humida usada nas experiencias:
Fig. *A* — Córte transversal da primeira laminula.
Fig. *B* — Córte transversal da cavidade inferior da camara.
Fig. *C* — Parte inferior da camara vista de cima.
Fig. *D* — Córte transversal da camara completa.
Fig. *E* — Vista geral de uma folha, mostrando, com fraco aumento do microscopio, a area coberta pela camara.

Estampa 27

Fig. *A* — Fases sucessivas da formação dos cristais num pêlo de uma folha media. Desenhos feitos com Obj. 40 e 0c.10. Os desenhos *a-i* correspondem ás observações feitas resp. em 26-7, 27-7, 30-7, 31-7, 5-8, 7-8, 12-8, 13-8 e 14-8, 1940.
Fig. *B* — Observações sucessivas da formação dos cristais num pêlo de uma folha velha, onde não ha formação de cristais. Desenhos feitos com Obj. 40 e 0c. 10. Os desenhos *a-j* correspondem ás observações feitas resp. em 24-7, 25-7, 26-7, 27-7, 29-7, 1-8, 5-8, 8-8, 13-8 e 15-8, 1940.

Estampa 28

Fig. *A* — Fases sucessivas da formação dos cristais numa folha nova (aumento do microscopio como na fig. *A* da Est. 27). Os desenhos *a-i* correspondem ás observações feitas resp. em 4-9, 5-9, 6-9, 8-9, 10-9, 11-9, 12-9, 17-9 e 19-9, 1940.
Fig. *B* — Microfotografia de pêlos de uma folha sadia. (Obj. 20 0c. 8).
Fig. *C* — Microfotografia de pêlo de uma folha destacada, mostrando cristais 9 dias após a inoculação. (Obj. 20 0c. 8).

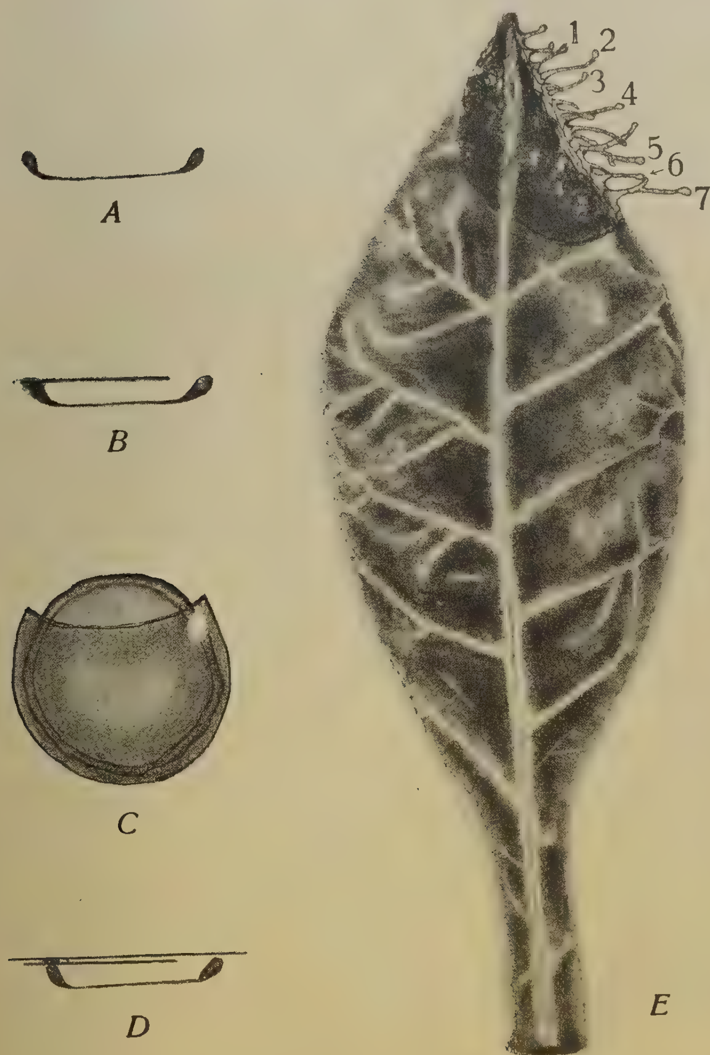
Estampa 29

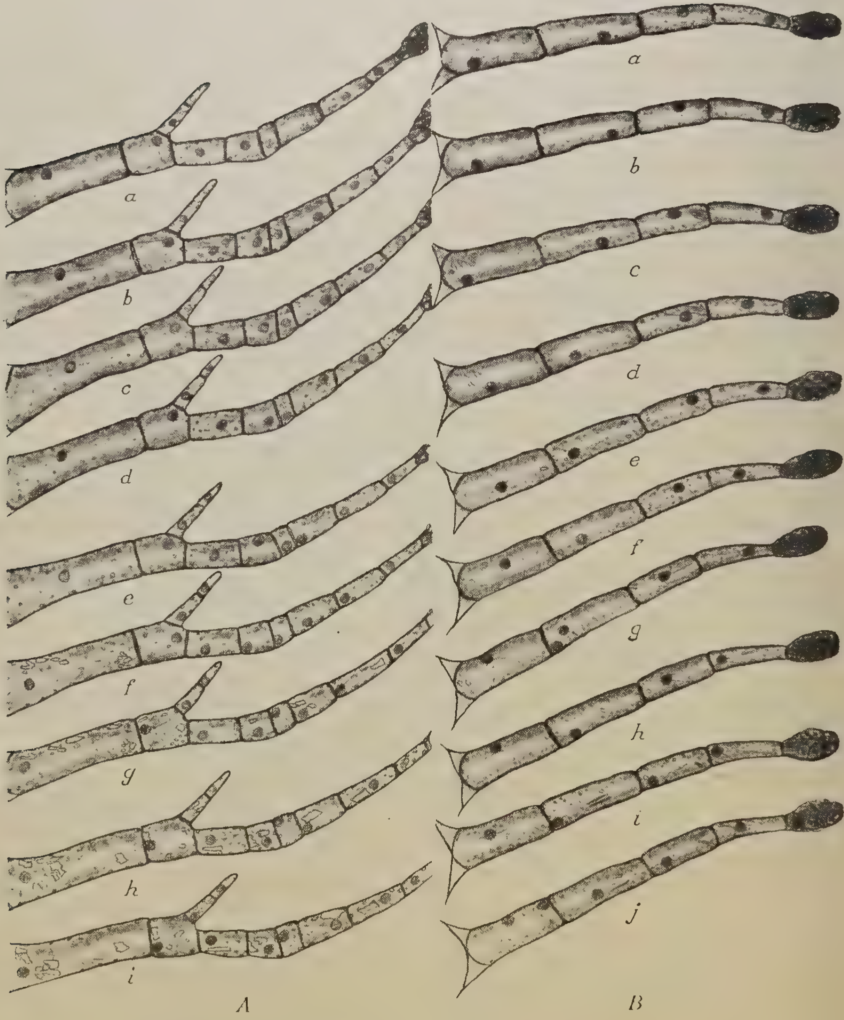
Fig. *A* — Vista geral da camara ajustada á folha, mostrando a maneira de se encherem as cavidades da camara com agua.
Fig. *B* — Dispositivo para a observação microscopica de folhas destacadas, vista de perfil.
Fig. *C* — O mesmo dispositivo, visto de cima.

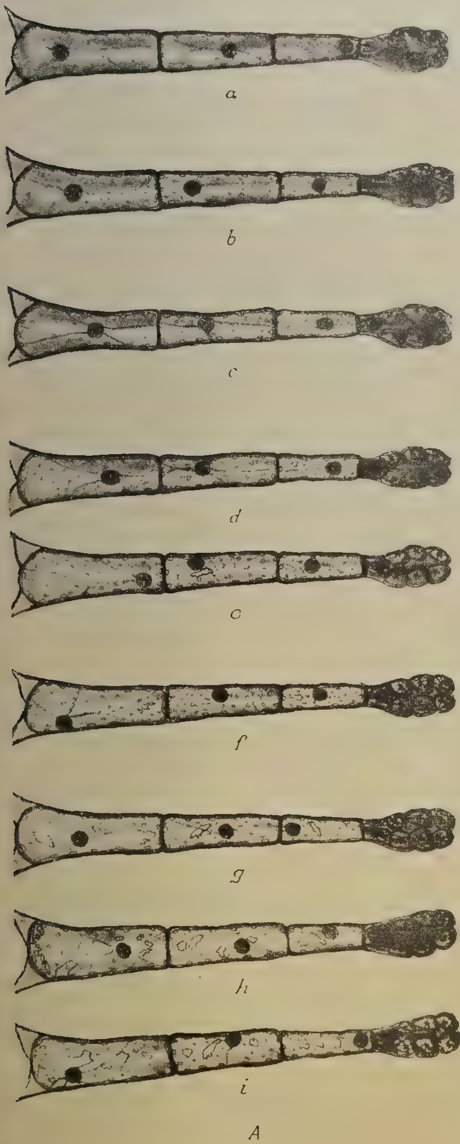
Estampa 30

Fig. *A* — Fases sucessivas da formação dos cristais num pêlo de folha destacada. Aumento do microscopio como na fig. *A* Est. 27. Os desenhos *a-f* correspondem ás observações feitas resp. em 3-9, 4-9, 5-9, 8-9, 11-9 e 12-9, 1940.
Fig. *B* — Fases sucessivas da formação de um numero reduzido de cristais numa outra folha destacada. (Aumento do microscopio como na fig. *A* Est. 27). Os desenhos *a-e* correspondem ás observações feitas resp. em 3-9, 4-9, 5-9, 9-9 e 10-9, 1940.

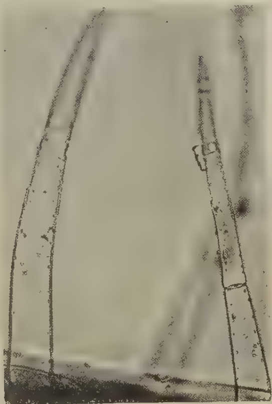
-o-


1
2
3
4
5
6
7
A
B
C
D
E

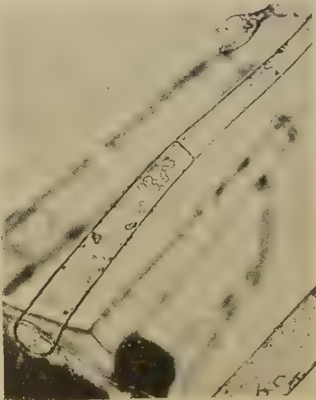

a
b
c
d
e
f
g
h
i
A
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
B



A



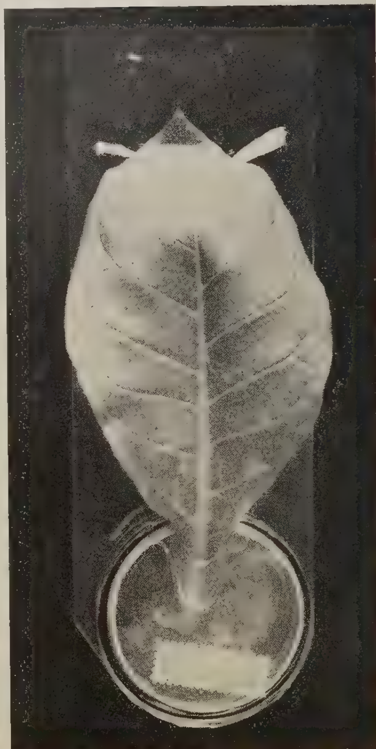
B



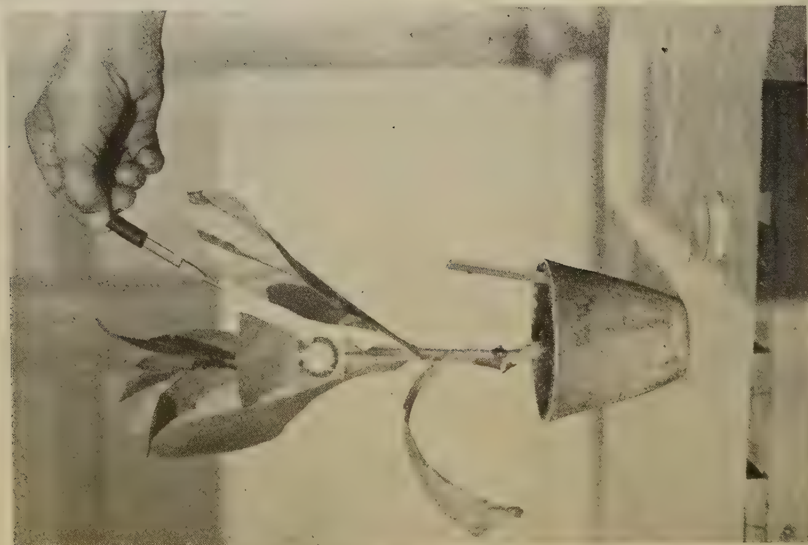
C



B



C



A



A



B

"ROCHANAIA GUTMANSI", nov. gen. n. sp., NOVO LAMELIBRANQUIO DO BRASIL *

POR

F. Lange de Morretes

Da Universidade de São Paulo - Brasil

Com 1 figura no texto e estampas 31-32

Em fevereiro de 1939 recebi do Sr. Dr. MARGER GUTMANS, Geologo do Instituto Agronomico de Campinas, para determinação, uma interessante Naiade. Disse-me o Dr. GUTMANS ter colhido a referida concha em solo triássico, cortado por um ribeirãozinho perto de Nioáque, no Sul do Estado de Mato Grosso.

Pelas informações recebidas, todas as conchas tinham sido extraídas de rocha homogenea, o que excluia a hipotese de infiltração posterior; no entanto elas não ofereciam as caracteristicas de fossil. Apesar de alguns dos exemplares examinados ainda estarem envolvidos por dois terços em rocha sedimentar, o seu estado de conservação era surpreendente; tinham ainda bem conservado o nacar das valvas e, uma delas, a epiderme.

Esses fatos levaram-me a duvidar seriamente da existência dessa concha, desconhecida para a ciência, em camadas tão antigas.

Fiz uma excursão a Nioáque no Estado de Mato Grosso, afim de estudar *in loco* o suposto fossil.

No decimo dia de exaustivo trabalho, encontrei o animal vivo em uma grande lage de arenito que atravessa o leito do Rio Nioáque, no lugar denominado Cedro, da Fazenda Forquilha, 14 quilometros abaixo de Nioáque.

As conchas encontravam-se encravadas em fendas da rocha, muitas vezes formando pequenas colonias em buracos.

Foi um trabalho fatigante, no qual me auxiliou corajosamente o agrimensor Sr. CARLOS DOBES, aquem aqui deixo consignados os meus agradecimentos, o de arrancar, debaixo da agua, da rocha que lhes envolvia $^1/_2$ a $^2/_3$ do corpo, certo numero de exemplares da concha.

Esta deve existir em varios pontos do Rio Nioáque, pois na margem direita deste rio, em Nioáque mesmo, encontrei uma meia valva no meio do pedregulho, para lá levada e depositada pelas enchentes.

(*) — Trabalho apresentado para o volume jubilar do Prof. ROCHA LIMA (Arq. Inst. Biol., Vol. 11, 1940).

Rochanaia, nov. gen.

Concha de conformação completamente irregular; bastante solida; de estrutura em parte lamelar, em parte corrugada ou granular; que tem constante um sinus ventral e um sulco ventro-apical, dividindo-a em dois lobulos mais ou menos distintos.

Genotipo: *Rochanaia gutmansi*, n. sp.

Rochanaia gutmansi, n. sp.

Estampa 31, figs. *A-F* e estampa 32, figs. *G-J*

Tipo: Coleções do Departamento de Geologia e Paleontologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. N.º IX-227.

Localidade-tipo: Rio Nioáque, Lugar Cedro, Municipio de Nioáque, 14 kms. abaixo de Nioáque, Estado de Mato Grosso.

Coletor: F. Lange de Morretes — 13 de abril de 1939.

Concha entumecida, muito irregular, profundamente sulcada em sentido umbo-ventral, formando com grande e profundo sinus ventral, dois lobulos, dos quais o anterior bem inferior ao posterior em tamanho; estrias de crescimento bem acentuadas, onduladas, mostrando, pela irregularidade de crescimento, protuberancias e nodosidades muito acentuadas na parte anterior; cerrada anteriormente e aberta posteriormente; porção umbonal compressa em sentido da linha dorsal; ligamento exterior opistodetico, curto e proeminente, levantado e excavado em sua parte anterior; impressão do musculo adutor posterior quasi circular, profunda e ligada à pequena impressão do retrator; impressão do musculo adutor anterior alongada e bem pronunciada; impressão do protrator anterior diminuta e separada, mais ou menos na altura média, do adutor anterior; linha paleal integra; margem prismatica só na parte posterior; charneira irregular, incompleta sem dente; sinus ligamentar triangular.

MEDIDAS DO TIPO: N.º IX-227

Comprimento	46 mm
Altura	35 mm
Diametro	27 mm
Umbo	23 mm
Comprimento do ligamento	10 mm
Diametro maior da impressão muscular posterior .	7 mm
" menor " " " " .	6 mm
" maior " " " anterior .	8 mm
" menor " " " " .	3 mm

MEDIDAS DO COTIPO: COLEÇÃO DO MUSEU PAULISTA N.º 14.589

Estampa 32, figs. *K, L, M, N*

Comprimento	. . . .	50 mm
Altura	. . . .	43 mm
Diametro	. . . .	34 mm
Umbo	. . . .	25 mm
Comprimento do ligamento	. . . .	10 mm
Diametro maior da impressão muscular posterior	.	9 mm
" menor " " " "	.	7 mm
" maior " " " anterior	.	10 mm
" menor " " " "	.	4 mm

Habitat: Um ribeirãozinho, perto de Nioáque, Estado de Mato Grosso.

Coletor: Dr. MARGER GUTMANS.

O polimorfismo de *Rochanaia* torna dificil tomarem-se-lhe medidas precisas. Para as medições foi adotado o seguinte criterio:

Colocada a margem ligamentar anterior em linha horizontal, foram medidos os extremos horizontais e verticais, de acôrdo com o esquema abaixo (fig 1):

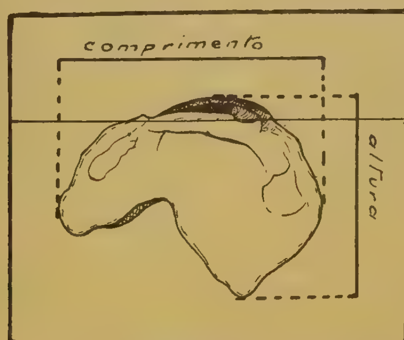


Fig. 1

As medidas do umbo tomadas, internamente, pela cavidade umbonal, por ser o ápice da concha de dificil localização.

Obtive de 25 conchas, medidas por este método, a seguinte tabela:

TABELA DE MEDIDAS

N.º	Comprimento	Altura	Diametro	Umbo
1	62 mm	39 mm = 62,9% do c.	26 mm = 41,9% do c.	19 mm = 30,6% do c.
2	60 "	35 " = 58,3% " "	27 " = 45 % " "	18 " = 30 % " "
3	55 "	33 " = 60 % " "	21 " = 38,1% " "	21 " = 38,1% " "
4	52 "	30 " = 57,6% " "	25 " = 48 % " "	14 " = 26,9% " "
5	48 "	36 " = 75 % " "	20 " = 41,6% " "	16 " = 33,3% " "
6	40 "	28 " = 70 % " "	17 " = 42,5% " "	11 " = 27,5% " "
7	44 "	33 " = 75 % " "	23 " = 52,2% " "	17 " = 38,6% " "
8	41 "	28 " = 68.2% " "	17 " = 41,4% " "	11 " = 26,8% " "
9	38 "	27 " = 71 % " "	19 " = 50 % " "	11 " = 28,9% " "
10	32 "	25 " = 78,1% " "	17 " = 53,1% " "	11 " = 34,2% " "
11	37 "	25 " = 67,5% " "	17 " = 45,9% " "	11 " = 29,7% " "
12	38 "	24 " = 63,1% " "	14 " = 36,8% " "	17 " = 44,7% " "
13	26 "	23 " = 88,4% " "	14 " = 53,8% " "	11 " = 42,3% " "
14	39 "	30 " = 76,9% " "	16 " = 41 % " "	13 " = 33,3% " "
15	38 "	34 " = 89,4% " "	21 " = 55,2% " "	14 " = 36,8% " "
16	50 "	43 " = 86 % " "	34 " = 68 % " "	25 " = 50 % " "
17	42 "	35 " = 83,3% " "	20 " = 47,6% " "	13 " = 30,9% " "
18	32 "	32 " = 100 % " "	17 " = 53,1% " "	10 " = 31,2% " "
19	28 "	24 " = 58.7% " "	15 " = 53,5% " "	10 " = 35,7% " "
20	32 "	28 " = 87,5% " "	19 " = 59,3% " "	14 " = 43,7% " "
21	46 "	38 " = 82,6% " "	24 " = 52.1% " "	20 " = 43,4% " "
22	31 "	26 " = 83,8% " "	18 " = 58 % " "	13 " = 41,9% " "
23	31 "	24 " = 77,4% " "	14 " = 45,1% " "	14 " = 45,1% " "
24	34 "	27 " = 79,4% " "	19 " = 55,8% " "	15 " = 44,1% " "
25	46 "	35 " = 76 % " "	27 " = 58,6% " "	23 " = 50 % " "

Desta tabela de medidas verificamos, em 25 especimens medidos, toda a graduação de 26,8 a 50 porcento de comprimento para a localização do umbo.

Existe toda a escala de 36,8 a 68 porcento do comprimento para o diametro e de 57,6 a 100 porcento para a altura.

Dada esta grande variabilidade de *Rochanaia*, as suas relações porcentuais só podem ter valor muito restrito para a sistematica.

O sinus ligamentar é triangular, seu lado anterior vertical, o posterior grandemente obliquo.

A cor do nacar iridiscente, cinza claro amarelado na parte anterior e cinza azulado escuro na parte posterior da valva.

Margem prismatica só na parte posterior a partir do sinus ligamentar, larga, de côr ainda mais escura do que a parte adjacente da concha, não perceptivel no bordo ventral e anterior da concha.

Cuticula muito fina, de côr parda.

PARTE ANATOMICA

Manto: Em sua parte media membranoso, nos bordos bastante volumoso, bem aderente, deixando, principalmente na parte posterior da concha, impressões muito acentuadas.

Abertura anal: Abertura anal separada da branquial por uma conexão do manto.

Abertura branquial: Abertura branquial munida de finas papilas.

Branquia externa: A branquia externa não cobre a interna na parte anterior.

Branquia interna: A branquia interna é livre na parte anterior.

Septos: Os septos são bem desenvolvidos.

Palpos: Semilunares.

Pé: Muito pequeno.

Dedico o gênero ao eminente cientista Prof. H. DA ROCHA LIMA e agradeço ao Sr. Dr. MARGER GUTMANS, a quem dedico a espécie, o grande prazer que me proporcionou, confiando-me para estudo a interessante espécie, por ele, pela primeira, vez colhida.

"ROCHANAIA GUTMANSI", N. G., N. SP., NEW LAMELLIBRANCHIAN MOLLUSK FROM BRAZIL

Abstract

A new genus and a new species of naiad from the Nioac river, in the State of Mato-Grosso, are described.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 31

Rochanaia gutmansi, nov. gen. n. sp. (Tipo)

Fig. *A* — Vista externa da valva direita.
Fig. *B* — Vista externa da valva esquerda.
Fig. *C* — Vista interna da valva direita.
Fig. *D* — Vista interna da valva esquerda.
Fig. *E* — Vista dorsal.
Fig. *F* — Abertura posterior.

Estampa 32

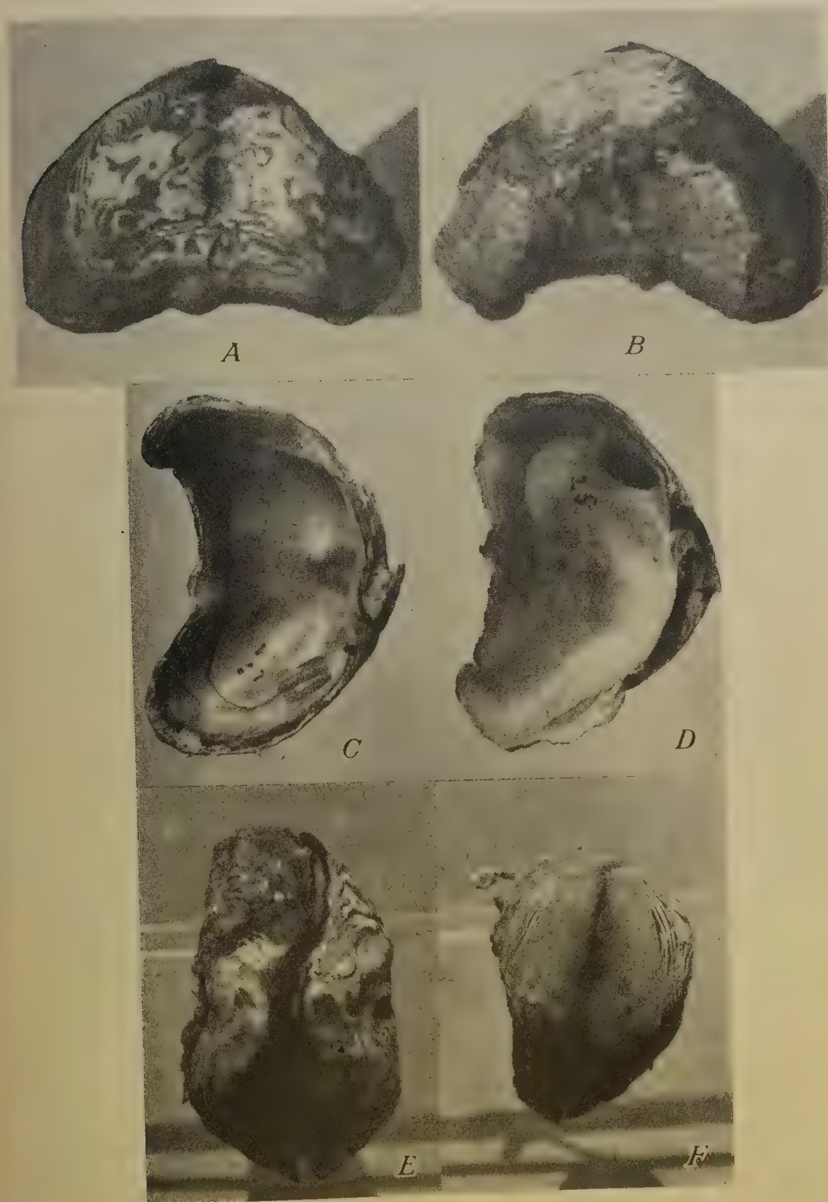
Rochanaia gutmansi, nov. gen. n. sp. (Tipo)

Fig. *G* — Manto — parte esquerda
Fig. *H* — Branquias externa e interna.
Fig. *I* — Branquia interna — pé — palpo.
Fig. *J* — Abertura anal — abertura branquial.

Rochanaia gutmansi, nov. gen. n. sp. (Cotipo)

Fig. *K* — Vista externa da valva direita.
Fig. *L* — Vista externa da valva esquerda.
Fig. *M* — Vista interna da valva direita.
Fig. *N* — Vista interna da valva esquerda.

———o———


A
B
C
D
E
F


G
H
I
J
K
M
L
N

Vol. 12 — Art. 6 Outubro de 1941

ENSAIOS DE VACINAÇÃO CONTRA A CÓLERA AVIÁRIA

POR

J. Reis e P. Nóbrega

Do Instituto Biologico de S. Paulo

A obtenção de bacterina eficiente contra a cólera é um dos problemas capitais da patologia aviária entre nós. Contraditória é a literatura acumulada sobre o assunto, como se pode ver em REIS e NÓBREGA (7), mas a impressão dominante é a de que são muito mais numerosos os casos de insucesso flagrante que os de êxito favoravel.

A possibilidade de vacinar solidamente com amostra "azul" de *Pasteurella avicida*, artificialmente obtida, foi há alguns anos estudada pelos autores (4) ; a propria essência do processo, entretanto, que comporta aplicação de vacina viva, apesar de inócua, torna-o de dificil generalização, não permitindo o preparo de estoques apreciaveis de vacina, nem sua distribuição "larga manu" para uso pelos próprios criadores. Alem disso, a capacidade antigênica da amostra em questão não é absolutamente estavel, podendo oscilar de maneira sensivel, conforme verificou um de nós (J. R.).

Tal estado de cousas justifica, pois, de maneira plena até o momento, a afirmação, feita por um de nós em trabalho recente (6), de que o combate eficaz à colera deve continuar a basear-se, antes de tudo, em cuidadosa eliminação de portadoras, nos moldes por nós estabelecidos (3) e que veem sendo aplicados em nossos trabalhos de rotina no I. Biológico de S. Paulo.

A pesquisa de novos tipos de bacterinas continua a ser feita, de maneira metódica, em nosso laboratório, sendo o presente trabalho relatório de algumas das experiências recentemente realizadas.

Comparamos os resultados de vacinações feitas com quatro tipos de bacterinas, nos quais variou a natureza dos agentes esterilizantes, que foram, respectivamente, o formol, a saponina, o calor e a prata, assim como, em um caso, as condições de obtenção de cultura. Em todos os casos as bacterinas continham grande massa de antígeno, bem maior do que é hábito na prática comum do preparo de vacinas.

Já há muitos anos nos ocupamos com o uso de vacinas saponinadas contra a cólera, inspirados nos bons resultados obtidos na imunização anticarbunculosa. As experiências, que permaneceram inéditas, haviam dado resultados desanimadores e deixado patente que a adição de saponina a culturas virulentas não conseguia impedir a generali-

zação da infecção, quando injetada por via intradérmica, em diluição próxima do limite de infecciosidade.

Há dois anos, porem, surgiu o trabalho de DELPY e RASTEGAR, em que se relatam ótimos resultados obtidos na prevenção da pasteurelose dos bovinos e dos búfalos pelo emprego de culturas mortas e lisadas sob ação de saponina. Retomamos porisso nossas experiências, tomando por molde os protocolos dos autores acima referidos. Não conseguimos, entretanto, observar a "lise" por êles descrita, nem com amostras de *P. avicida* nem com amostras de *P. boviseptica*, o que talvez se explique pela marca da saponina usada, que em nossos trabalhos foi da fábrica Schuckhardt.

LOEWENTHAL refere, em seu trabalho sobre preparo de sôro contra estreptococos hemolíticos, que as culturas em determinada fase precoce do crescimento, quando é mais nitida a existência de uma espécie de "cápsula" em torno do germe, o que tambem pudemos observar com amostras de *P. avicida*, revelam poder antigênico muito maior do que em outras ocasiões. Tal fato justificaria, a nosso ver, o uso de culturas novas como bacterinas, nas mesmas condições em que usadas para produção de soro.

O uso da prata como agente esterilizante foi inspirado nos resultados de RAINSFORD com bactérias do grupo tífico.

Finalmente, as bacterinas formoladas foram preparadas para servir de controle aos tres métodos acima referidos. Alem da grande concentração de antígeno que representam, nada mais apresentam de particular.

MATERIAL E MÉTODOS

Os diferentes tipos de vacinas foram preparados como a seguir se explica. Usamos sempre a amostra P 307, de nossa coleção, que é tipicamente fluorescente.

B a c t e r i n a A (c o m n i t r a t o d e p r a t a) — Cultura vegetada em agar, em garrafa de Kolle, durante 24 hs. a 37° é suspensa em 100 cc. de agua distilada esteril; após pernoite em geladeira, ajuntam-se 100 cc. de sol. de nitrato de prata a 0,007%. Estufa a 37° durante 4 horas. Centrifugação em centrífugo de angulo (sistema Lundgren) a 3.500 r.p.m.

B a c t e r i n a B (c o m c u l t u r a s j o v e n s) — Em balões contendo 100 cc. da agua peptonada de Ward e Lyons (*) com 5% de soro esteril de coelho, semeiam-se 10 cc. de cultura de 24 hs., no mesmo meio, da amostra P 307. Ao fim de 3 horas de incubação a 37°

(*) Agua dist. 100; neopeptona Difco 2,5; dextrose 0,05. Ferver, ajustar a pH 7.3, filtrar em papel, distribuir, autoclavar a 10 libras por 15 minutos (8).

a cultura é centrifugada em centrífugo de ângulo a 3.500 r.p.m., durante 1 hora, e o depósito suspenso em 10 cc. de água fisiológica. Esta suspensão é inativada 15 minutos a 55° C. e usada como bacterina, sem diluição.

Bacterina C (com saponina) — Culturas da amostra P 307 em 200 cc. de caldo Hottinger, incubadas durante 24 horas a 37°, são centrifugadas em centrífugo de ângulo durante 1 hora a 3.500 r.p.m. e o depósito suspenso em 12 cc. de caldo Hottinger e depois diluido a 1:10 em solução a 5% de saponina (sap. puriss. de Schuckhardt). Conserva-se a mistura em geladeira durante o tempo necessário à esterilização, o qual é pelo menos de 9 dias. A suspensão não clareia e ao fim desse tempo o esfregaço revela abundância de corpos bacterianos íntegros.

Bacterina D (formolada) — Preparada de maneira idêntica á seguida para obtenção da bacterina C, com a diferença de que a diluição a 1:10 se fez, não em saponina, mas em caldo Hottinger, ajuntando-se depois 0,5% de formol ao volume final obtido. Deixa-se na geladeira durante o tempo necessario à esterilização, o qual é, em em geral, menor que 9 dias.

Via de vacinação — A vacina saponinada foi sempre usada por via subcutânea; a formolada, por via subcutânea na 1.ª dose e muscular na segunda; as demais, por via muscular.

Infecção experimental — A infecção experimental foi feita 18 dias após a ultima injeção de vacina e consistiu na inoculação intramuscular de 1 cc. de diluição a 1:100 de cultura de P 307 crescida a 37° durante 24 horas.

Animais — Os animais de experiência eram frangos Leghorn brancos de 2 meses aproximadamente.

REAÇÃO PROVOCADA PELAS VACINAS

As bacterinas *A*, *B* e *D* não provocam reação alguma. A bacterina *C* provoca reação local, que consiste em necrose no ponto de inoculação, de 1 a 2 cms. de diametro, que interessa apenas a pele e praticamente desaparece em 8 dias. Na bacterina saponinada experimentada, a concentração final de saponina era de 0,5%; concentrações maiores mostraram-se desaconselhaveis pela gravidade das reações provocadas, (grande edema e extensa e profunda necrose com morte do animal, às vezes) as quais não melhoraram de maneira alguma a resistência a subsequente infecção por pasteurela virulenta. A gravidade da reação provocada pela saponina a 5% pode, aliás, ser obviada pelo empre-

go de menor volume de inóculo, por exemplo 0,1 cc., caso em que a reação se limita a edema e pequena zona de necrose, que cedo desaparecem.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com o uso das quatro bacterinas acima em lotes de 10 aves estão resumidas na tabela. As vacinas foram usadas em 2 doses de 1 cc. cada, com intervalo de 7 dias.

TABELA

Capacidade imunizante de 4 tipos de bacterinas contra a cólera. A= bacterina morta por ação oligodinâmica da prata. B= bacterina preparada com culturas de 3 horas. C= bacterina saponinada. D= bacterina formolada. Doses de 1 cc.

Bacterina	N.º de aves vacinadas	N.º de aves que resistem à infeção	Porcentagem de sobreviventes
A — (1 só dose)	10	2	20 %
A — (2 doses)	10	3	30 %
B	10	2	20 %
C	28	0	0 %
D	10	3	30 %
Controles não vacinados	16	0	0 %

Da inspecção da tabela pode concluir-se que, mesmo usando bacterinas altamente concentradas, e aplicando duas doses, o grau de proteção conferido às aves é muito pequeno, não ultrapassando 30% nos melhores casos (bacterinas A (2 doses) e D).

VACCINATION AGAINST FOWL CHOLERA WITH FOUR DIFFERENT KINDS OF BACTERINS

Abstract

This paper deals with the immunizing power of four bacterins against fowl cholera the preparation of which has been described in detail. All bacterins are strongly concentrated and were made with the same "fluorescent" strain of Pasteurella avicida.

In bacterin A the germs were killed by the oligodynamic action of silver according to Rainsford's method (5). *Bacterin B was prepared with 3 hours' cultures killed at 56º for 15 minutes according to Loewenthal's method* (2). *In bacterin C and D the germs were respectively killed by saponine and formaline.*

Two doses of bacterin have been given to each bird with an interval of 7 days between them. The results of the infection of the birds with a fluorescent strain of P. a v i c i d a (the same one used for making the bacterins) are tabulated in the portuguese text and show that under the best circumstances (bacterins A and D) no more than 30% of the vaccinated birds display a marked degree of resistance against the infection.

BIBLOGRAFIA

1 — Delpy, L. e Rastegar, R. — 1938 — Sur une nouvelle méthode de vaccination contre la pasteurellose des bovins et des buffles. *Rev. d'Immunologie,* 4, 322-339.

2 — Loewenthal, H. — 1938 — The preparation of protective sera against haemolytic streptococci. *Brit. Jour. Exp. Path.* 19, 143-155.

3 — Nóbrega, P. e Reis, J. — 1937 — Sobre o reconhecimento de portadores na cólera aviária e a persistência da *P. a v i c i d a* nesses animais. *Arq. Inst. Biol.* (S. Paulo) 8, 183-188.

4 — Nóbrega, P. e Reis, J. — 1938 — Vacinação contra cólera aviária com amostra viva (tipo azul) de *P. a v i c i d a. Arq. Inst. Biol.* (S. Paulo) 9, 77-84.

5 — Rainsford, S. G. — 1939 — Sterilization of T.A.B.C. vaccines. *Jour. Hyg.* (Camb.), 39, 131-142.

6 — Reis, J. — 1939 — Duração da imunidade conferida por injeções simultâneas de *P. a v i c i d a* e sulfanilamida. *Arq. Inst. Biol.* (S. Paulo), 10, 301-303.

7 — Reis, J. e Nóbrega, P. — 1936 — *Doenças das Aves* (Tratado de Ornitopatologia) ed. I. Biológico de S. Paulo, pp. 163-164.

8 — Ward, H. K. e Lyons, C. — 1935 — Studies on the hemolytic streptococcus of human origin. *Jour. exper. med.,* 61, 515-529.

—————o—————

Vol. 12 — Art. 7 Outubro de 1941

PRODUÇÃO DA VACINA CONTRA A ESPIROQUETOSE AVIÁRIA EM OVOS EMBRIONADOS

POR

P. Nóbrega e J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Durante muito tempo empregamos no Instituto Biológico, com excelentes resultados, a vacina originalmente preparada por ARAGÃO (1) e que consiste em mistura, em partes iguais, de glicerina e sangue rico de espiroquetas. Posteriormente (2) verificamos que se podia reduzir a concentração do sangue na vacina muito alem do limite estabelecido por ARAGÃO, pois um produto contendo 10% de sangue infetado em glicerina a 50% dava resultados absolutamente satisfatórios. Alem disso começamos a utilizar no preparo da vacina não somente sangue mas tambem orgãos (particularmente fígado, baço e pulmão) de galinha injetada 4-5 dias antes com espiroqueta. Observamos nestas condições imunidade completa 2 dias após a inoculação de vacina preparada com 40 grs. de orgãos em 300 cc. de glicerina a 50% (2). Obtivemos desta maneira produto mais econômico, pois nas condições expostas consegue-se preparar em média 1 litro de vacina com orgãos duma só galinha, ao passo que pela técnica antiga se obtinham, no máximo, 200 cc. por ave.

Ultimamente, baseados na capacidade de multiplicação do *Treponema gallinarum* em embriões de pinto, demonstrada primeiramente por SCHAEFER (3), conseguimos preparar vacina que apresenta, ao lado da simplicidade de técnica, todas as vantagens dum produto altamente eficaz e econômico.

TÉCNICA DO PREPARO DA NOVA VACINA

1 — No 12.º dia de incubação, examinam-se os ovos no ovoscópio e assinala-se externamente a posição do embrião, depois de verificar a vitalidade deste.

2 — Com estilete ou agulha forte faz-se pequeno orifício na casca, na região da câmara de ar, afim de impedir aumento da pressão no interior do ovo e refluxo do inóculo no momento da inoculação do embrião.

3 — Com broca de dentista ou, mais simplesmente, com agulha de injeção, perfura-se a casca em um ponto da região assinalada no 1.º tempo, depois de desinfetada.

4 — Através desse orifício injetam-se 0,05 ou 0,1 cc. de sangue de galinha rico de espiroquetas.

5 — Fecham-se com parafina esteril ambos os orifícios feitos na casca e recolocam-se os ovos inoculados na estufa a 37°, onde permanecem por 5 dias; ao fim desse tempo os espiroquetas encontram-se no seu máximo de multiplicação.

6 — Abrem-se os ovos e aproveitam-se, para preparo da vacina, a membrana corioalantóica, o liquido aniótico e os orgãos do embrião, especialmente coração, fígado e pulmão. Membrana e orgãos são bem triturados em gral e suspensos no liquido aniótico adicionado de água fisiológica de modo a ter volume total de 30 cc. Adiciona-se formol na razão de 0,5% e deixa-se macerar na geladeira durante 24 horas, ao fim das quais costumam estar mortos os espiroquetas. Filtra-se em gaze, usando-se como "suspensão-mãe" o filtrado assim obtido.

EXPERIÊNCIA 1

Doze galinhas são divididas em 3 grupos, recebendo as aves de cada grupo, por via intramuscular, respetivamente 1 cc. de diferentes diluições da suspensão-mãe em água fisiológica. Quatro dias depois da vacinação todas as galinhas vacinadas e mais 2 testemunhas recebem 0,5 cc. de sangue rico de espiroquetas. A tabela 1 mostra os resultados desta experiência.

TABELA 1

Atividade da vacina contra a espiroquetose aviária feita em ovos embrionados. Dose 1 cc. intramuscular

Galinhas	Diluição da suspensão-mãe	Data da vacinação	Data da inoculação com espiroqueta	Presença de espiroquetas no sangue			
				2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
289	Não diluida	23-9-40	27-9-40	0	0	0	0
290		»	»	0	0	0	0
433		»	»	0	0	0	0
440		»	»	0	0	0	0
431	66 %	»	»	0	0	0	0
436		»	»	0	0	0	0
437		»	»	0	0	0	0
438		»	»	0	0	0	0
432	50 %	»	»	0	0	0	0
434		»	»	0	0	0	0
435		»	»	0	0	0	0
439		»	»	0	0	0	0
Test. 1	—	—	»	++	+++	+++	+++
Test. 2	—	—	»	++	+++	+++	+++

Conclusão — Nas condições expostas, isto é, fazendo a inoculação de espiroquetas 4 dias após a vacinação, verifica-se que cada ovo pode dar o rendimento mínimo de 60 doses de vacina, número que é na realidade maior, como veremos em experiências seguintes.

EXPERIÊNCIAS 2 E 3

Procuramos comparar o rendimento de vacinas contra a espiroquetose preparadas respectivamente em ovos embrionados e em galinha. No primeiro caso empregamos 5 ovos e completamos o volume final para 150 cc.; no segundo, preparamos, de acordo com a técnica habitual, suspensão glicerinada de sangue e orgãos de 10 galinhas injetadas 4 dias antes com espiroqueta, sendo de 3000 cc. o volume total de vacina assim obtida. Os resultados deste grupo de experiências estão resumidos nas tabelas 2 e 3.

TABELA 2

Rendimento de vacina preparada com sangue e orgãos de galinha. Dose 1 cc., intramuscular

Galinhas	Diluição da vacina	Data da vacinação	Data da inoculação de espiroqueta	Presença de espiroquetas no sangue		
				28-10	29-10	30-10
78	1:2	23-10	25-10	0	0	0
286		»	»	0	0	0
177		»	26-10	0	0	0
430		»	»	0	0	0
325		»	25-10	0	0	0
427		»	»	0	0	0
151	1:4	»	26-10	0	0	0
137		»	»	0	0	0
91		»	25-10	0	0	0
104	1:8	»	»	0	0	0
283		»	26-10	+	++	+++
425		»	»	+	+++	+++
Test. 1		—	25-10	+	+++	+++
Test. 2		—	26-10	++	+++	+++

TABELA 3

Rendimento da vacina preparada em ovos embrionados. Dose 1 cc., intramuscular

Galinhas	Diluição da suspensão-mãe	Data da vacinação	Data da inoculação do espiroqueta	Presença de espiroquetas no sangue		
				28-10	29-10	30-10
284	1:2	23-10	25-10	0	0	0
318		»	»	0	0	0
432		»	26-10	0	0	0
393		»	»	0	0	0
57	1:4	»	25-10	0	0	0
149		»	»	0	0	0
44		»	26-10	0	0	0
118		»	»	0	0	0
423	1:8	»	25-10	++	+++	+++
431		»	»	0	0	0
435		»	26-10	++	+++	+++
438		»	»	0	0	0
Test. 1	—	—	25-10	++	+++	+++
Test. 2	—	—	26-10	+	+++	+++

Conclusão — A vacina preparada em galinhas dá rendimento médio de 1200 doses para cada ave e determina imunidade completa já no fim de 48 hs. A diluição 1:8, correspondente a 2400 doses, produz imunidade parcial.

A vacina preparada em ovos embrionados dá rendimento médio de 120 doses por ovo e determina imunidade completa já ao fim de 48 hs. A diluição 1:8, correspondente a 240 doses, produz imunidade parcial.

EXPERIÊNCIA 4

Conservação da vacina — Um lote de vacina preparado em ovo e conservado na geladeira a 5°C. é experimentado após 5 meses e meio. Os resultados constam da tabela 4.

TABELA 4

Vacina preparada em 21-8-40 e provada novamente em 3-2-41. Dose 1 cc. intramuscular

Galinhas	Diluição da suspensão-mãe	Data da vacinação	Data da inoculação de espiroqueta	Presença de espiroquetas no sangue		
				7-2-41	9-2	10-2
1	1:8	3-2-41	5-2-41	0	0	0
2	1:4	»	»	0	0	0
3	1:2	»	»	0	0	0
4 (test.)	—	—	++	+++	+++	+++

Conclusão — A vacina preparada em ovo e guardada na geladeira durante 5 meses e meio (tempo máximo de observação até o momento) conserva perfeitamente suas propriedades imunizantes e apresenta ao fim desse tempo rendimento aproximado de 120 doses por ovo.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os autores descrevem nova técnica de preparo da vacina contra a espiroquetose das aves baseada no cultivo dos espiroquetas em ovos embrionados. O produto obtido é altamente eficiente e apresenta, em relação à vacina até aqui preparada a partir de sangue e orgãos de galinha, todas as vantagens duma técnica simples, rápida e econômica. Em 6 dias apenas, obtem-se já a vacina pronta para o consumo sob a forma de líquido de côr pardacenta, completamente fluido e facilmente injetavel, ao contrário do produto obtido de galinha, que é suspensão glicerinada cujo preparo requer em média 18 dias.

Do ponto de vista econômico apresenta ainda vantagens evidentes, se considerarmos que o rendimento de 10 ovos corresponde ao de uma galinha, o que significa redução de pelo menos 50% no preço de custo da nova vacina.

Quanto à conservação do produto, nossas observações se estenderam até o momento a 5 meses e meio, ao fim dos quais a vacina conserva todas as suas propriedades imunizantes. Deste ponto de vista é provavel que tenha a vacina preparada em ovo capacidade de conservação praticamente indefinida, à semelhança do que acontece com o produto obtido de galinha, o qual, segundo nossas observações, se mostra perfeitamente ativo após 5 anos à temperatura ambiente.

ON A NEW VACCINE AGAINST FOWL-SPIROCHAETOSIS BASED ON THE CULTIVATION OF "TREPONEMA GALLINARUM" IN THE CHICK-EMBRYO

Abstract

Embryonated eggs are inoculated on the 12th. day of incubation with 0.05- 0.1 cc. of chicken blood containing live spirochaetes. The inoculation is made directly into the embryo by means of a sterile needle and syringe and is easily performed through a tiny hole made in the egg shell at a convenient point. (A small hole is also drilled at the blunt pole of the egg, to relieve inside pressure and facilitate inoculation). After sealing with paraffin the two holes made in the shell, the egg is put back in the incubator at nearly 37°. On the 5th day following inoculation, when the growth of the spirochaetes is at a maximum, the egg is opened and the organs and membranes of the

embryo mixed with the amniotic fluid, ground together and finally suspended in saline to make the final volume up to 30 cc. 0,5% of formaline is added to the suspension, which is left 24 hours in the ice-box to macerate and then filtered through sterile gauze. The filtrate thus obtained will be referred to as the "stock suspension".

A 25% dilution of the stock suspension in saline has proved to be quite efficient as an immunizing means against fowl-spirochaetosis when used at the dose of 1 cc. per bird intramuscularly.

The vaccine keeps well and as far as our observations go it shows no lessening of activity after 5½ months of storage in the ice-box.

Regarding cost, time and facility of production this vaccine proves to be superior to the usual type of vaccine against fowl-spirochaetosis, which is made with blood and organs of infected chickens suspended in glycerol.

BIBLIOGRAFIA

1 — Aragão, H. B. — 1911 — Soroterapia e vacinação na espiroquetose das galinhas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **3**, 3-39.

2 — Reis, J. e Nobrega, P. — 1936 — Tratado de *Doenças das Aves* — ed. do Instituto Biológico — S. Paulo, pp. 230-231.

3 — Schaefer, W. — 1939 — Fortführung von *Spirochaeta gallinarum*- Stämmen in Eipassagen, *Zent. f. Bakt.* I, O., **143**, 460-462.

———o———

Vol. 12 — Art. 8 Outubro de 1941

SÔBRE TINGITIDEOS (HEMIPTERA) DE COSTA RICA COM DESCRIÇÕES DE ESPECIES NOVAS

POR

Oscar Monte

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 4 figuras no texto

Por gentilesa do Dr. ALEXANDER BIERIG, o autor recebeu uma pequena coleção de tingitideos de Costa Rica. Essa coleção, de 38 especimens, contém 10 espécies, cinco das quais são descritas como novas. Todos os especimens foram colhidos pelo DR. A. BIERIG, exceção feita do exemplar de *Monanthia c-nigrum* CHAMPION, que pertencia à ex-coleção NEVERMANN. Todos os tipos e parátipos foram incorporados à coleção particular do autor.

Phatnoma marmorata CHAMPION

Um exemplar de Ciruela, 30-IX-1940. E' uma das espécies mais comuns do gênero, muito espalhada na América Central e agora pela primeira vez citada de Costa Rica.

Aepycysta decorata, n. sp.

Fig. 1

Cabeça castanho-escura, brilhante, com cinco espinhos um tanto espêssos; o par anterior mais curto do que o posterior e dirigido para frente; o mediano curvado para baixo; o posterior bem longo. Antenas amareladas e bastante longas, com leve pubescência, tendo o ápice do IV segmento, escuro; o I pouco maior que o II; o III uma vez e meia maior que o IV.

Pronoto levemente opaco e disfarçadamente puncturado; unicarenado, com as carenas laterais ausentes; a mediana fortemente foliácea e entumecendo-se atraz. A parte laminar que fica entre a vesícula e a porção globosa posterior da carena é formada por duas longas células, sendo a anterior muito mais estreitada. Vesícula muito alta, bem mais que a porção entumecida da carena, com aréolas largas e um orificio em cada uma das células superiores. Paranotos bem levantados e formados por três largas células.

Élitros um pouco alargados, estreitando-se bastante para o ápice; área costal uniseriada, formada por largas e compridas células; subcostal uniseriada e as células largas e mais ou menos pentagonais. A parte terminal dos élitros forma uma pequena elevação, mais ou menos oval.

Colorido geral pálido, transparente. Nervuras escuras. A vesícula, a porção entumecida da carena e a elevação túmida, escuras. Margens dos élitros e dos paranotos, serreadas. Patas muito longas e amareladas.

Comprimento: 2.11 mm.; largura: 1.04 mm.

Holótipo (macho), colhido em San Isidro de Coronado, Alajuela, Costa Rica, 20-X-1940, batendo a rede na relva.

Esta espécie modifica em parte o conceito do gênero, pois possue somente uma carena, em vez de três. E' um tanto próxima de *A. schwarzii* (DRAKE), do Panamá, da qual se distingue pelos seguin-

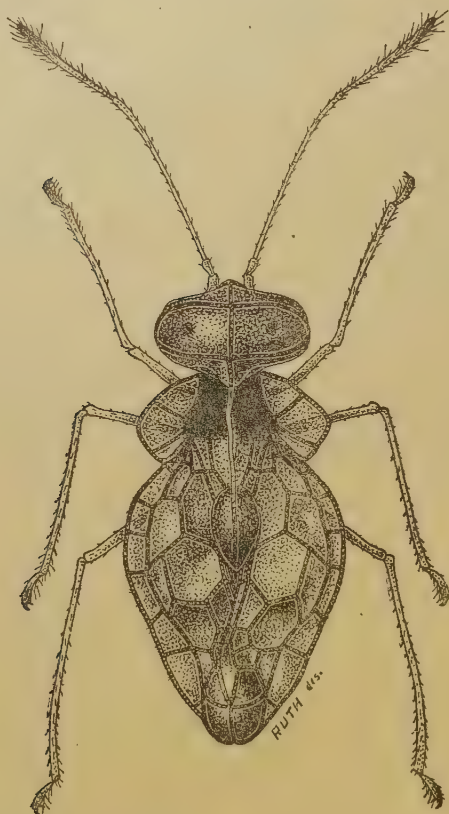


Fig. 1 — *Aepycysta decorata* MONTE, n. sp.

tes caracteres: ausência das carenas laterais; formato dos élitros, ovalados e estreitados para o ápice; presença da elevação túmida; e paranoto mais estreitado.

E' esta a terceira espécie do gênero, sendo as outras duas: *A. schwarzii* (DRAKE), do Panamá e *A. undosa* DRAKE & BONDAR, da Baía, Brasil. Para determinação das espécies pode ser utilisada a seguinte chave:

1 — Com carenas laterais 3
2 — Sem carenas laterais 4
3 — Vesicula e parte posterior da carena mediana com máculas *undosa* D. & B.
" " " " " " sem " *schwarzii* (DRAKE)
4 — Vesicula e parte posterior da carena mediana com máculas e o ápice dos élitros elevado . . . . *decorata* MONTE

Amblystira melanosoma, n. sp.

Fig. 2

Colorido preto, salvo os três primeiros segmentos antenais, as patas e grande parte da área costal.

Cabeça sem espinhos. Antenas amareladas, exceto o IV segmento; o I igual em comprimento ao II; o III o dobro do IV; êste é escuro e coberto com pêlos. Abertura rostral larga e o rostro alcançando o metasterno.

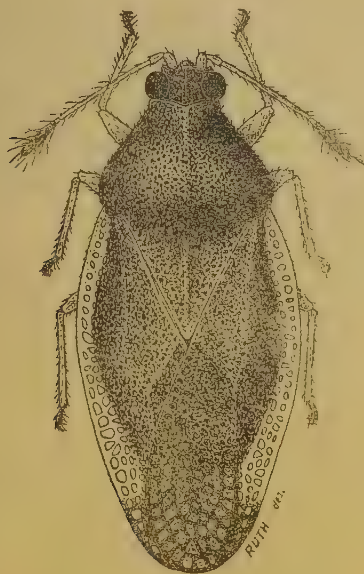


Fig. 2 — *Amblystira melanosoma* MONTE, n. sp.

Pronoto bastante levantado, estreitando-se posteriormente, bem punctura-do; unicarenado, com a carena distinta, mas sem aréolas.

Élitros largos, estreitando-se para o ápice; as aréolas das áreas discoidal e subcostal, punctiformes; a costal larga, clara, na mór parte biseriada, no centro com uma ou duas carreiras com uma só célula, sendo a parte mais larga, triseriada; subcostal muito alta, com 5-6 carreiras de aréolas punctiformes; a discoidal

larga, alcançando a metade dos élitros, com seis carreiras na sua maior largura. As últimas carreiras de aréolas da área costal, são escuras.

Comprimento 2.77 mm.; largura 1.25 mm.

Holótipo (fêmea), de San Isidro de Coronado, Alajuela, Costa Rica, 27-X-1940.

A presente espécie é bastante próxima de *A. marginata* DRAKE, do Panamá, mas distingue-se à primeira vista pelo pronoto unicarenado, pela mancha fosca na parte terminal dos élitros e por ter a área costal um pouco mais alargada.



Fig. 3 — *Leptodictya fraterna* MONTE, n. sp.

Leptodictya fraterna, n. sp.

Fig. 3

Semelhante na côr e forma, a *L. madellinae* DRAKE, *L. grandatis* DRAKE e *L. williamsi* DRAKE, porém muito menor em tamanho, com a vesícula bem mais apertada e a carena mediana mais baixa.

Antenas delgadas longas e escuras, salvo o III segmento, que é amarelado; o I quasi de três vezes maior que o II; o III mais de três vezes maior que o IV. Cabeça com 5 longos e erectos espinhos; o par anterior quasi alcançando a extremidade do I segmento antenal; o mediano no alótipo curvado, mas nos outros exemplares, erecto e dirigido para frente; o parte posterior dirigido para cima e para os lados. Rostro alcançando as coxas medianas. Pronoto bastante elevado, com forte puncturação, escuro, acastanhado na declividade, e claro e reticulado na porção triangular; tricarenado, as carenas levemente elevadas e distintamente areoladas; a mediana um pouco mais levantada. Vesícula medianamente grande, apertada um pouco para a frente, não se lançando sôbre a cabeça. Paranotos claros, um tanto levantados, a margem dobrada quasi tocando as carenas laterais na parte anterior.

Élitros alargando-se posteriormente, as extremidades separadas, as margens externas fortemente serreadas. A área costal larga, as aréolas irregulares na distribuição e no tamanho, as do interior muito menores; a carreira externa com as aréolas escuras, a parte anterior totalmente clara e a posterior com aréolas foscas e claras, mas com todas as nervuras escuras; quatro nervuras fortes estrangulam esta área, e essas nervuras são metade claras, metade negras. A subcostal diminutamente biseriada; a discoidal alcançando a metade dos élitros, extreitada para as extremidades, correndo no seu meio, em sentido longitudinal e obliquo, uma linha levemente escura; o ápice manchado de nervuras escuras; a sutural escurecida.

Comprimento 3.65 mm.; largura 1.86 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e dois parátipos, de San Isidro de Coronado, Alajuela, Costa Rica, em 27-X-1940.

Menor tamanho, e élitros diferentemente marcados, separam-na de *L. williamsi* DRAKE.

Leptodictya nigra, n. sp.

Totalmente negra, exceto os paranotos, as patas e os espinhos da cabeça, que são claros; a vesícula com aréolas claras, mas cercadas por nervuras pretas.

Cabeça escura com 5 espinhos testáceos, medianamente desenvolvidos; o par anterior chegando até á metade do primeiro segmento antenal; o par posterior não erecto e levemente dirigido para baixo. Antenas longas, bem escuras, porem com uma leve tonalidade amarelada no ápice do I segmento, e nas bases dos III e IV; o I é o dobro do II; o III duas vezes e meia maior que o IV; os dois primeiros reunidos, menores do que o IV.

Rostro alcançando a altura do segundo par de patas. Búcula fechada na frente.

Pronoto bem erguido, com forte puncturação; a porção triangular bem reticulada; tricarenado, as carenas distintamente areoladas, sendo a mediana um pouco mais elevada e as laterais, paralelas. Vesícula disfarçadamente levantada e indistintamente um pouco mais alargada atraz. Paranoto mais ou menos plano,

quasi totalmente biseriado, as aréolas de traz menores, pelo que êle é um pouco mais estreitado nesta parte, terminando com uma só carreira de aréolas.

Élitros largos, mais ou menos arredondados, as extremidades separadas, as margens externas fortemente serreadas por mais de 2/3 do seu comprimento; área costal larga, com duas a tres nervuras fortemente marcadas, tendo seis carreiras de aréolas na sua maior largura, estando as aréolas dispostas mui irregularmente; subcostal biseriada; discoidal larga, comprida, estreitada na base e ápice e extendendo-se além da metade dos élitros; a nervura que a limita pelo lado externo é bem saliente, notando-se que esta área possue uma leve declividade para o lado externo.

Comprimento 3.73 mm.; largura 1.82 mm.

Holótipo (macho) e alótipo (fêmea) e 16 parátipos, de San Isidro de Coronado, Alajuela, Costa Rica, 27-X-1940.

Parece-me mais perto de *L. fusca* DRAKE e *L. circumcincta* CHAMPION. Da primeira distingue-se por não ter a vesícula grande e lançada para frente, pelas antenas totalmente escuras, pelos espinhos mais curtos, pelos paranotos não com 2-3 carreiras de aréolas, pelos élitros distintamente serreados, pela área costal muito mais estreita. Da segunda, pela ausência da mancha clara nos élitros, os espinhos da cabeça muito mais curtos, os paranotos largos na frente e estreitados atraz.

Leptopharsa divisa (CHAMPION)

Nove exemplares de San Isidro de Coronado, Alajuela, Costa Rica, em 27-X-1940. Em sua descrição original CHAMPION descreve-a com dois espinhos na cabeça mas os exemplares estudados apresentam cinco espinhos, assim distribuidos: o par posterior muito curto, testáceo e deitado na superficie da cabeça; o mediano e o par posterior escuros e um tanto curtos; o mediano repousa a extremidade apical sôbre o ápice dos dois anteriores, que se tocam. A subcostal, "nearly as wide as the discoidal", segundo a descrição original, discorda nos presente exemplares, pois se apresenta bem mais estreita.

Depois da descrição original é a primeira vez que se fazem referências a esta espécie, que ainda não fôra relacionada na fauna costariquense.

Gargaphia patricia (STAL)

Um exemplar de La Cañada, Tierra Blanca, C. Rica, 15-IX-1940. E' uma das espécies mais largamente espalhadas por toda a América Central e adjascências. Na literatura não consta sua distribuição geográfica em Costa Rica, mas nossa coleção possue muitos exemplares ali colhidos.

Gargaphia interrogationis, n. sp.

Fig. 4

Paranoto, terceiro segmento antenal, vesícula, área costal e patas (exceto os tarsos), amarelados; o restante ferrugíneo.

Cabeça com três espinhos mais ou menos longos, os do par anterior tocando-se nas extremidades; o mediano erecto e um pouco mais longo do que os outros dois. Antenas com o I segmento tendo o dobro do II; o III um pouco mais do



Fig. 4 — *Gargaphia interrogationis* Monte, n. sp.

dobro do IV; os I e II segmentos, ferrugineos; o III amarelado e o IV preto com pêlos curtos.

Pronoto bem levantado, com forte exudação branca junto á vesícula, nitidamente puncturado, tornando-se mais largamente reticulado na porção triangular; tricarenado, as carenas laterais quasi indistintamente areoladas e um pouco constrictas para a base; a mediana bem levantada no meio e aí com aréolas bem visiveis. Vesícula mais alta do que larga, semelhante, em forma, a de *Leptopharsa bondari* Drake & Poor, mas bem mais alta.

Paranoto testáceo, arredondado, mais largo na frente do que atraz, levemente convexo, biseriado, as células da frente mais largas, uniseriado atraz, as margens indistintamente serreadas.

Abertura rostral larga e o rostro alcançando até a linha do segundo par de patas.

Élitros longos, ovalados, ferrugineos, a costal amarelada e a sutural fosca. A área costal biseriada, com células largas, as aréolas da metade posterior, maiores; subcostal triseriada; a discoidal curta, com quatro carreiras de aréolas na sua maior largura.

Comprimento 2.38 mm.; largura 1.04 mm.

Holótipo (macho), de Pacora, Costa Rica, colhido em 20-XI-1940.

Parece-me próxima de *G. vanduzeei* GIBSON. A descrição apresentada por GIBSON para sua espécie é incompleta, porque o único exemplar estudado estava estragado. Entretanto a área subcostal mais alta, a ausencia de nervuras escurecidas transversais na área costal, separa-a de *G. vanduzeei* GIBSON.

Monanthia c-nigrum CHAMPION

Um exemplar de S. José (Capital), Costa Rica, em 21-II-1922. Esta espécie é comum nos paises da América Central e já foi relacionado de Costa Rica. Este exemplar pertenceu à ex-coleção NEVERMANN.

ON TINGITIDAE (HEMIPTERA) FROM COSTA RICA WITH DESCRIPTIONS OF NEW SPECIES

Abstract

This paper is a contribution to the knowledge of tingitidae from Costa Rica and deals with five new species.

———o———

Vol. 12 — Art. 9 Novembro de 1941

ESTUDOS SOBRE "TEMNOCEPHALIDAE MONTICELLI, 1899", COM ESTABELECIMENTO DE DOIS NOVOS GÊNEROS AUSTRALIANOS E DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES NEOTRÓPICAS

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 22 figuras no texto

INTRODUÇÃO

As espécies americanas do gênero *Temnocephala* estavam muito mal estudadas, com excepção de *T. chilensis* e em parte de *T. brevicornis*.

Em trabalho publicado no ultimo volume desta revista, pensamos ter esclarecido suficientemente a situação de *T. brevicornis*, estabelecendo os fatos fundamentais relativos à sua morfologia, bionomia, ecologia e sistemática.

Das espécies assinaladas na América, foi-nos impossível obter material de *T. chilensis* (MOQUIN-TANDON, 1846), *T. mexicana* VAYSSIÈRE, 1898, *T. axenos* MONTICELLI, 1899 e *T. digitata* MONTICELLI, 1902, motivo pelo qual nos abstemos de as discutir no presente trabalho. A mesma atitude mantivemos quanto às espécies não americanas, geralmente tão mal conhecidas tambem, que se torna impossivel a análise correta de sua validez.

Da experiência adquirida no estudo do material brasileiro, resultou a convicção de ser necessário o estabelecimento de dois novos gêneros para espécies da região australiana; tivemos igualmente oportunidade de encontrar mais duas espécies novas, vivendo sobre crustáceos brasileiros de água doce.

Na descrição e redescrição das espécies brasileiras resolvemos, para economizar espaço, fazer um estudo da anatomia do gênero, no que ela tem de mais comum, reservando para as descrições específicas apenas os fatos particulares a cada espécie tratada.

Abstivemo-nos de referir a extrutura histológica das espécies estudadas, sempre que ela coincidiu com as verificações feitas em *T. brevicornis* e já publicadas no ano passado, de modo a evitar que o presente trabalho se tornasse muito extenso.

ESTADO ATUAL DA FAMÍLIA *TEMNOCEPHALIDAE* MONT., 1899

Temnocephala BLANCHARD, 1849, foi a primeira designação genérica atribuida a *Branchobdella chilensis* MOQUIN-TANDON, 1846, desde que se reconheceu não caber essa especie em nenhum gênero conhecido de hirudíneos, grupo em que *T. chilensis* foi incluida pelos primeiros pesquisadores.

Posteriormente, à medida que foi aumentando o conhecimento do assunto e novas espécies foram sendo descritas, a posição sistemática de *Temnocephala* e gêneros afins passou a sofrer modificações frequentes, tendo sido incluidos ora entre os trematoides, ora entre os turbelários, para, finalmente, na opinião de BENHAM, 1901, VON GRAFF, 1903, MONTICELLI, 1904, BRESSLAU, 1912, MERTON, 1913 e BAER, 1931, ser considerada uma classe autônoma, para a qual deve prevalecer a denominação *Temnocephaloidea* BENHAM, 1901, sôbre a de MONTICELLI, 1904, como reconhece BAER, 1931.

Para conter o gênero *Temnocephala*, foi creada a família *Temnocephalidae* MONTICELLI, 1899, compreendendo duas subfamílias: *Temnocephalinae* MONTICELLI, 1899, com os gêneros *Temnocephala* BLANCHARD, 1849, *Craspedella* HASWELL, 1893 e *Dactylocephala* MONTICELLI, 1899; *Actinodactylellinae* MONTICELLI, 1899, com apenas o gênero *Actinodactylella* HASWELL, 1893.

A subfamília *Actinodactylellinae* foi elevada à categoria de família, tornando-se *Actinodactylellidae* BENHAM, 1901, pelo que resultou supérflua a primeira subfamília de MONTICELLI, ao mesmo tempo que *Temnocephalidae* MONTICELLI, 1899, passava a conter apenas os três primeiros gêneros.

Em 1905, *Temnocephalidae* é acrescida de mais um gênero: *Craniocephala* MONTICELLI, 1905, ficando portanto com quatro.

Em 1931, entretanto, BAER erigiu *Craspedella* em nova família, *Craspedellidae* BAER, 1931, voltando, portanto, *Temnocephalidae* a conter três gêneros.

O exame do material do gênero *Temnocephala*, por nós obtido, deu-nos a impressão de que as espécies do gênero padeciam de heterogeneidade, no que diz respeito a todo o material descrito da Tasmânia e Nova Zelândia e uma espécie da Austrália ocidental.

Realmente, a existência de cinco tentáculos é tão característica nas espécies bem estudadas do gênero *Temnocephala*, tanto na América como na Austrália e Nova Guiné, que nos parece dever constituir um carater primordial na delimitação do gênero.

Assim sendo, torna-se inevitavel a criação de dois novos gêneros, um para conter as espécies tasmânicas, com quatro tentáculos e um lobo mediano, e outro para incluir a espécie neozelandesa e a única australiana, ambas providas de seis tentáculos:

Temnomonticellia n. g.

Caracteres: *Temnocephalidae* apresentando quatro tentáculos anteriores e um lobo mediano. Anatomia interna insuficientemente conhecida.

Espécie tipo: *Temnomonticellia quadricornis* (HASWELL, 1887) n. comb.

Hospedeiro: *Astacopsis franklini* GRAY

Procedência: Tasmânia septentrional.

Outras espécies:

T. aurantica (HASWELL, 1900) n. comb.

Hospedeiro: *Astacopsis* sp.

Procedência: La Dee. — Tasmânia.

T. tasmanica (HASWELL, 1900) n. comb.

Hospedeiro: *Astacopsis franklini tasmanicus* ERICH.

Procedência: Hobart. — Tasmânia.

Temnohaswellia n. g.

Caracteres: *Temnocephalidae* apresentando seis tentáculos anteriores. Anatomia interna insuficientemente conhecida.

Espécie tipo: *Temnohaswellia novae-zelandiae* (HASWELL, 1887) n. comb.

Hospedeiro: *Paranephrops neo-zelandicus* WHITE e *P. setosus* HUTTON

Procedência: Nova Zelândia

Outra espécie:

T. comes (HASWELL, 1893) n. comb.

Sinônimo: *Temnocephala simulator* HASWELL, 1924

Hospedeiro: *Astacopsis serratus* SHAW.

Procedência: Austrália ocidental.

Temnocephala BLANCHARD, 1849

Diagnose genérica: *Temnocephalidae* de porte pequeno ou médio. Corpo de contorno aproximadamente elíptico, apresentando grande convexidade dorsal e ligeira concavidade ventral, com cinco apêndices digitiformes anteriores, relativamente longos, sempre muito extensiveis, sendo o mediano ligeiramente mais longo que os laterais, e um acetábulo subterminal, musculoso e geralmente pedunculado. Um par de olhos duplos, prefaringeanos, sempre pigmentados. Boca subterminal e ventral. Faringe com dois esfíncteres, um anterior, pequeno, e outro posterior, grande. Duas vesículas excretoras com abertura externa dorsal. Hermafroditas. Quatro testículos. Um ovário. Ovos pedunculados.

Espécie tipo: *Temnocephala chilensis* (MOQUIN-TANDON, 1846)

Sinônimos: *Branchobdella chilensis* MOQUIN-TANDON, 1846
Astacobdella chilensis DIESING, 1850
Temnocephala tumbesiana WACKE, 1905

Hospedeiros: *Aeglea loevis* (LATREILLE), *Aeglea* sp. e *Parastacus* sp.

Procedência: Chile

Outras espécies:

a) espécies americanas:

T. brevicornis MONTICELLI, 1889
Sinônimo: *T. brevicornis intermedia* MERTON, 1922
Hospedeiros: diversos quelônios de água doce.
Procedência: Terezopolis, Angra dos Reis, Viçosa, Rezende, São Paulo.-Brasil.

T. jheringi HASWELL, 1893
Hospedeiro: *Ampullarius lineatus* SPIX
Procedência: Mato Grosso.-Brasil.

T. mexicana VAYSSIÈRE, 1898
Hospedeiro: *Cambarus digueti* BOUVIER
Procedência: México

T. axenos MONTICELLI, 1899
Sinônimos: *T. chilensis* MONTICELLI, 1889
T. brasiliensis MERTON, 1922
Hospedeiro: *Aeglea loevis* (LATREILLE)
Procedência: Porto Alegre, Blumenau, Jararaca.-Brasil

T. digitada MONTICELLI, 1902
Hospedeiro: *Paloemonetes argentinus* NOB.
Procedência: Rio da Prata

T. microdactyla MONTICELLI, 1903
Hospedeiro: *Trichodactylus (Dilocarcinus) orbicularis* (MENSCHEN)
Procedência: Mato Grosso.-Brasil.

T. lutzi MONTICELLI, 1913
Hospedeiro: *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI.
Procedência: São Paulo-Brasil.

T. travassosfilhoi n. sp.
Hospedeiro: *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI
Procedência: São Paulo, S. Bernardo.-Brasil.

T. lanei n. sp.
Hospedeiro: *Trichodactylus* sp.
Procedência: Juquiá-Brasil.

b) espécies australianas:

T. fasciata HASWELL, 1887
Sinônimo: *T. bifasciata* MONTICELLI, 1889
Hospedeiro: *Astacopsis serratus* SHAW.
Procedência: Austrália meridional.

T. minor HASWELL, 1887
Hospedeiro: *Paracheraps bicarinatus* GRAY
Procedência: Nova Gales do Sul. — Austrália.

T. engaei HASWELL, 1893
Hospedeiro: *Engoeus fossor* ERICH.
Procedência: Gipslândia. — Austrália.

T. dendyi HASWELL, 1893
Hospedeiro: *Paracheraps bicarinatus* GRAY
Procedência: Nova Gales do Sul. — Austrália.

T. caeca HASWELL, 1900
Hospedeiro: *Phreatoicopsis terricola* SPENCER & HALL
Procedência: Colac.-Vitória. — Austrália.

T. chaeropsis HETT, 1925
Hospedeiro: *Chaeraps preissii* ERICH.
Procedência: Austrália ocidental.

c) espécies nerlandesas:

T. semperi WEBER, 1889
Sinônimo: *T. semperi celebensis* MERTON, 1922
Hospedeiros: *Potamon manii* RATHBURN, *P. adriatretum* ALCOCK, *P. andersonianum* (WOOD-MASON), *P. superciliosum* KEMP. e moluscos indeterminados.
Procedência: Ilhas Nerlandezas

T. rouxi MERTON, 1913
Hospedeiro: *Cheraps arvanus* ROUX.
Procedência: Ilhas Aru.

ESPÉCIES BRASILEIRAS DO GÊNERO *TEMNOCEPHALA*

GENERALIDADES

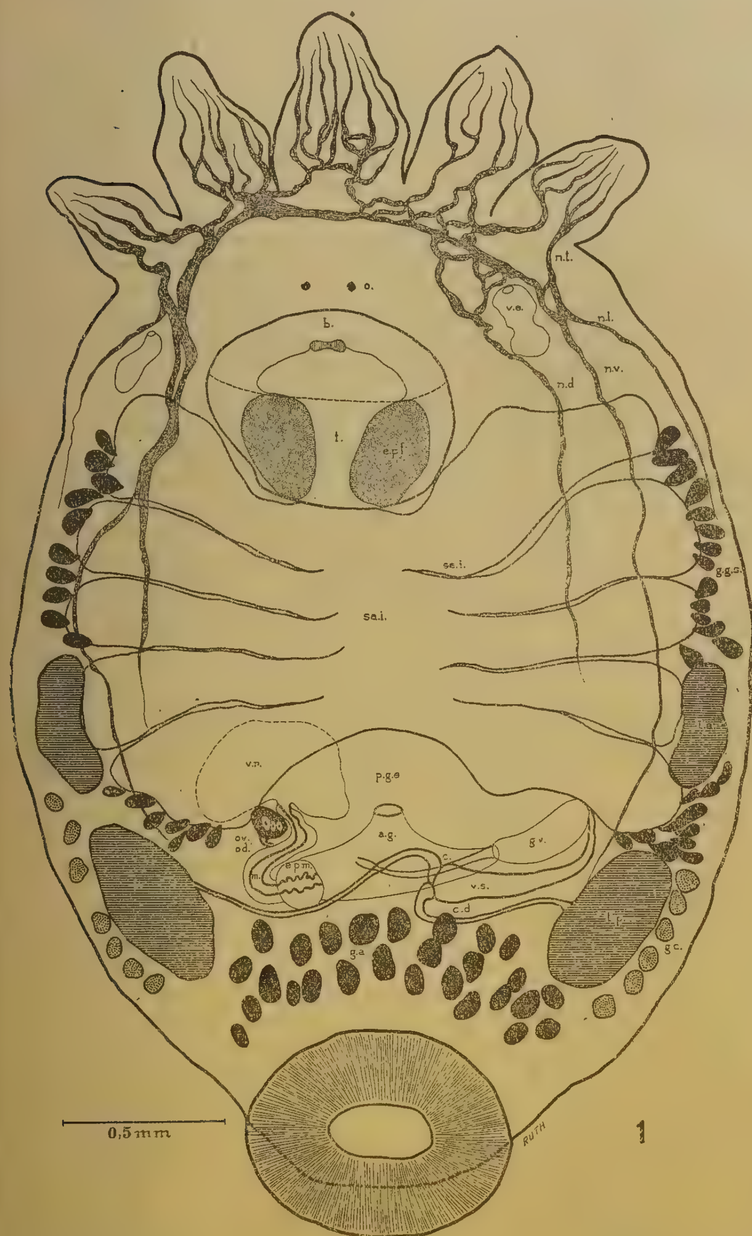
MORFOLOGIA EXTERNA: muito semelhante em todos os representantes do gênero, diferindo apenas em pequenos caracteres, como dimensões do corpo, diâmetro acetabular, comprimento dos apêndices digitiformes e maior ou menor pigmentação do epitélio. O contorno do corpo é sempre grosseiramente elíptico, apresentando anteriormente cinco apêndices mais ou menos longos e posteriormente um acetábulo, de contorno circular, subterminal, em geral bastante musculoso e pedunculado. O corpo é revestido por um epitélio sincicial.

APARELHO DIGESTIVO: muito semelhante em todos os representantes do gênero, constando de boca, faringe, esôfago, saco intestinal e anexos. Boca de contorno circular ou elíptico, maior eixo transverso, pequena, subterminal e ventral, na metade anterior do corpo. Faringe em geral grande, globoide ou elipsoidal, musculoso e forte, apresentando dois esfíncteres, um anterior, pequeno, e outro posterior, bastante desenvolvido. Esôfago sempre extremamente curto. Saco intestinal amplo; visto de face assemelha-se a alteres; internamente apresenta grande número de septos dotados de eixo músculo-conjuntivo e revestidos pelo epitélio intestinal. Anexos constituidos por glândulas unicelulares, representadas por dois tipos fundamentais: umas próximas ao faringe e esôfago — glândulas salivares; e outras em relação com o saco intestinal — glândulas grânulo-secretoras.

SISTEMA NERVOSO: muito semelhante em todas as espécies, constando de um grande gânglio cerebroide, prefaringeano, e um sistema de nervos, divididos em anteriores ou tentaculares, e tres pares de nervos posteriores, dos quais um ventral, outro dorsal e um terceiro lateral. Olhos pares, de estrutura dupla, prefaringeanos, dorsais, constando de cinco elementos celulares: duas células nervosas com perfil semilunar e situadas nas extremidades do orgão, duas de bastonetes, em forma de lentes biconvexas, que ficam logo para dentro dos elementos nervosos, e uma célula pigmentar, em forma de lente bicôncava que ocupa a parte média de cada olho.

APARELHO GENITAL: hermafrodita. Ha um poro genital externo, comum, ventral, na metade posterior do corpo, em comunicação com o átrio genital. O átrio genital é amplo e provido de elementos celulares de natureza glandular — glândulas atriais. E' revestido pelo epitélio do corpo, que apresenta a particularidade de ser anucleado. E' o aparelho genital particularmente característico em cada espécie e, principalmente, o orgão copulador masculino.

Fig. 1 — *T. microdactyla:* a.g.= átrio genital, b.= boca, c.= cirro, c.d.= canais deferentes, e.p.f.= esfincter posterior do faringe, e.p.m.= esfincter posterior do metratermo, f.= faringe, g.a.= glândulas atriais, g.c.= grândulas cimentadoras, g.g.s.= glândulas grânulo-secretoras, g.v.= glândula vesiculosa, m.= metratermo, n.d.= nervos dorsais, n.l.= nervos laterais, n.t.= nervos tentaculares, n.v.= nervos ventrais, o.= olhos, od.= oviducto, ov.= ovário, p.g.e.= poro genital externo, sa.i.= saco intestinal, se.i.= septos intestinais, t.a.= testículos anteriores, t.p.= testículos posteriores, v.e.= vesículas excretoras, v.r.= vesícula reabsorvente, v.s.= vesícula seminal.



Temnocephala microdactyla Mont. Ver legenda na página ao lado

APARELHO GENITAL ♂ : testículos em número de quatro, sendo dois anteriores e dois posteriores, dos quais estes são mais volumosos; estão situados na metade posterior do corpo, próximo às margens laterais, e unidos, o anterior ao posterior do mesmo lado, por meio de um ducto intertesticular. Estão dispostos de maneira que cada par tem as zonas coincidentes e os campos afastados, sendo o campo dos anteriores coincidente, ao menos em parte, com o campo dos posteriores correspondentes. Canais deferentes em número de dois, com origem na face medial do testículo posterior correspondente, sendo o da direita, devido à situação do aparelho copulador masculino à esquerda, sempre mais longo; são sempre de pequeno calibre e desembocam separadamente na vesícula seminal, dilatando-se em ampola, próximo à sua abertura distal. Vesícula seminal geralmente piriforme e alongada. Glândula vesiculosa elipsoidal. Cirro quitinoso, contido em uma bolsa (do cirro) de natureza músculo-conjuntiva. E' de forma característica para cada espécie, apresentando geralmente uma estrutura distal, constituida por espículos quitinosos. Abre-se no átrio genital, em seu ângulo súpero-esquerdo.

APARELHO GENITAL ♀ : ovário em geral pequeno e globoide, sempre à direita da linha mediana, na metade posterior do corpo, próximo e lateralmente à vesícula reabsorvente. Oviducto, sempre muito curto. Ootipo, porção do aparelho genital feminino onde se abrem o oviducto, viteloductos, vesícula reabsorvente e receptáculos seminais. Metratermo em geral longo e de paredes espessas, às vezes com poderoso esfíncter distal. Orifício genital feminino abrindo-se na parede súpero-lateral direita da cavidade atrial. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios com a mesma disposição geral em todos os representantes do gênero, sendo constituidos por folículos mais ou menos volumosos, sempre dispostos à maneira de uma rede anastomótica que envolve o saco intestinal, entrando com este em íntimas relações; viteloductos abrindo-se na parte correspondente ao ootipo. Vesícula reabsorvente, geralmente bastante grande, esferoidal ou em forma de calota esférica, acolada pela parede superior à face inferior do saco intestinal. Esta vesícula foi tomada a princípio como um verdadeiro receptáculo seminal; HASWELL, porém, que era tambem dessa opinião, constatou que os espermatozoides aí contidos não estavam vivos, corando-se dificil e desigualmente, e eram acompanhados por detritos das glândulas vitelínicas. Em 1893 HASWELL propôs-lhe o nome de receptáculo vitelino, por constatar que essa vesícula se enche de vitelo antes que o ovo se constitua, esvasiando-se posteriormente no ootipo; segundo BAER, esse mesmo autor, estudando as espécies australianas (1924), diz que a vesícula não pode esvaziar seu conteudo para o ootipo devido à conformação do canal que une esse dois orgãos. MERTON, 1913, propôs o nome de "vesicula resorbiens" por atribuir ao orgão a função de reabsorver o excesso de secreção das glândulas vitelínicas e dos testículos. Contudo, tivemos ocasião de verificar que, ao lado de detritos glandulares que aí se acumulam, esse orgão funciona frequentemente como um verdadeiro e grande receptáculo seminal; assim é que, em todas as espécies por nós estudadas, constatamos, em cortes histológicos, no interior do orgão, a presença de grande número de espermatozoides, corados perfeita e uniformemente e dispostos enoveladamente, como se apresentam nos pequenos receptáculos seminais anexos ao aparelho genital feminino e na vesícula seminal anexa ao aparelho genital masculino; além disso, em todas essas espécies e em grande número de exemplares, verificamos "in vivo" a presença dos espermatozoides no interior dessa vesícula, onde se apresentavam com plena vitalidade, a julgar pelos movimentos rápidos e constantes que exibiam. Portanto, não assiste razão a

HASWELL, quando afirma que os espermatozoides aí encontrados não estavam vivos. Por duas razões conservamos o nome de vesícula reabsorvente, dado por MERTON. Em primeiro lugar pela impossibilidade de conservar o nome de receptáculo seminal, uma vez que existem verdadeiros receptáculos seminais, à maneira de pequenas bolsas que se abrem no ootipo, logo abaixo da vesícula reabsorvente e que foram observados pela primeira vez por MERTON; tais receptáculos mostraram-se cons-

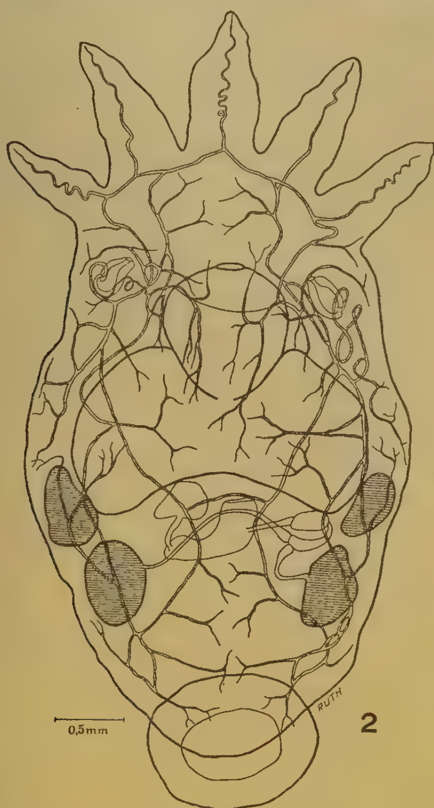


Fig. 2 — *T. brevicornis:* Aparelho excretor, a fresco (seg. Pereira & Cuocolo, 1940)

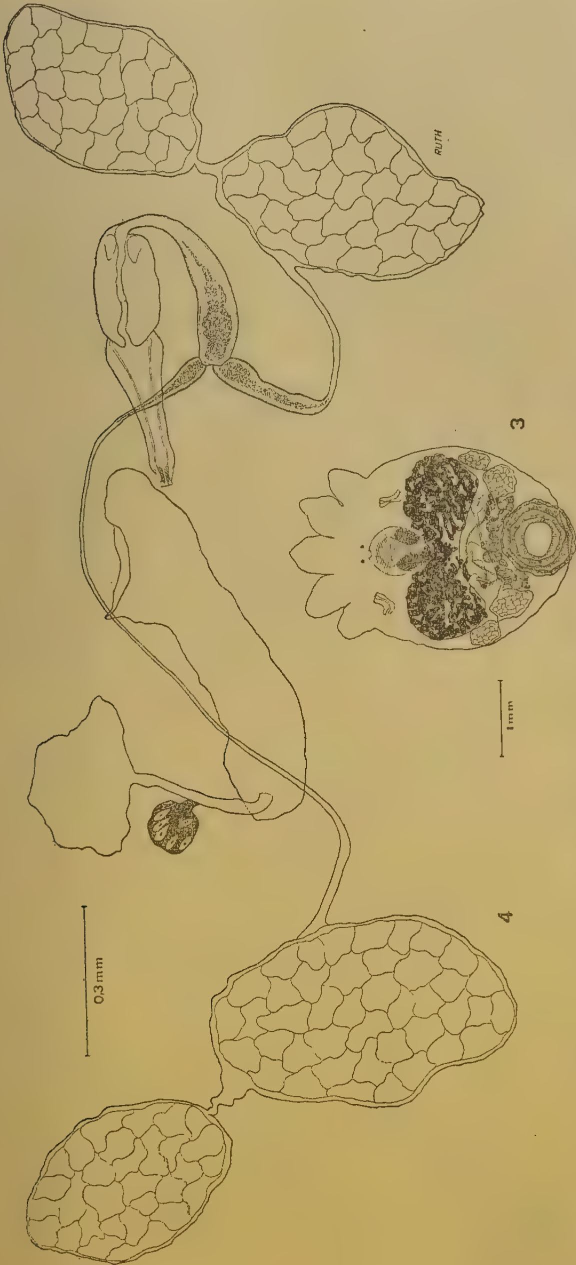
tantes em todas as espécies por nós estudadas. Em segundo lugar por parecer desempenhar esse orgão tambem uma função reabsorvente dos excessos de secreção do aparelho genital, pois frequentemente aí se encontram detritos e em particular restos vitelínicos. Um canal gênito intestinal como refere MERTON, 1913, nunca verificamos, apezar de termos feito numerosos cortes seriados em exemplares em diferentes estados de desenvolvimento de *T. brevicornis*, *T. microdactyla*, *T. lutzi* e *T. jheringi.* Receptáculos seminais, pequenas bolsas, geralmente elipsoidais, dispostas em círculo, abrem-se no ootipo, logo abaixo da vesícula reabsor-

vente. Glândulas cimentadoras, sempre presentes, unicelulares, volumosas, variaveis em forma, número e tamanho, dispõem-se lateralmente, para fora dos testículos, providas de canais excretores muito finos e longos. Glândula da casca, em geral pouco volumosa, evidenciavel em cortes histológicos. Glândulas do ootipo, unicelulares, piriformes, longas e em relação com o ootipo.

APARELHO EXCRETOR: obedece ao mesmo esquema geral em todos os representantes do gênero. Como tivemos ocasião de fazer dele um estudo suficientemente pormenorizado ao tratarmos, em trabalho precedente, de *Temnocephala brevicornis*, restringir-nos-emos agora somente aos fatos fundamentais. O aparelho excretor dos temnocéfalos pode ser muito bem estudado em exemplares vivos. Consta fundamentalmente de duas vesículas excretoras e de grande rede de canais excretores amplamente ramificados e anastomosados. As vesículas excretoras são em número de duas, com situação dorsal, simetricamente colocadas de cada lado da linha mediana, muito próximas às margens laterais do corpo, num plano transverso que ventralmente passa pelo faringe. São de forma muito variavel, mas geralmente tubulosas, tendo a porção mediana mais dilatada, abrindo-se dorsalmente por meio dos poros excretores externos. O sistema de canais excretores é muito complicado, podendo-se, contudo, distinguir quatro canais coletores principais, um par anterior e outro posterior. Cada canal anterior se anastomosa com o posterior do mesmo lado para, depois, por meio de um canal comum, mais ou menos longo e de percurso sinuoso e irregular, atingir a vesícula excretora correspondente. O par anterior é destinado à porção do corpo que fica para frente do faringe e particularmente aos tentáculos; ao nivel da linha mediana, na região correspondente à base dos tentáculos, os dois canais anteriores estão unidos por inosculação formando assim um grande arco, cuja concavidade olha para a extremidade caudal do animal, recebendo na sua convexidade cinco canais excretores tentaculares, um para cada tentáculo. O sistema de canais posteriores é muito mais desenvolvido, amplamente ramificado e anastomosado, correspondendo a toda porção do corpo que fica para trás do faringe.

TEMNOCÉFALOS DE QUELÔNIOS

Em 1889, MONTICELLI encontrou, nas coleções helmintológicas do Museu Zoológico de Copenhagen, numerosos exemplares de temnocefálos, rotulados como *Pentadion emydum* KRÖYER, colhidos no Brasil por REINHARDT, em outubro de 1856, sobre quelônios de água doce. MONTICELLI verificou tratar-se de espécie diferente das outras até então conhecidas, *T. chilensis* (MOQUIN-TANDON, 1846), *T. fasciata* HASWELL, 1887, *T. quadricornis* HASWELL, 1887, *T. minor* HASWELL, 1887 e *T. novae-zelandiae* HASWELL, 1887, denominando-a *T. brevicornis* MONTICELLI, 1889. Ficava assim ampliado o habitat dos temnocéfalos, pois todas espécies estudadas tinham sido encontradas em decápodos de água doce. Posteriormente, em 1898, esse mesmo autor descreveu-a em material proveniente de localidade não determinada do Brasil. Em 1922, MERTON estuda novo material brasileiro, colhido por BRESSLAU em 1913, creando, então, uma sub-espécie *Temnocephala brevicornis intermedia* MERTON, 1922, baseado em falsos caracteres,



T. brevicornis: Fig. 3 - Total, em toto-montagem (seg. Pereira & Cuocolo, 1940). Fig. 4 - Complexo genital, em toto-montagem (seg. Pereira & Cuocolo, 1940).

como tivemos ocasião de discutir em trabalho precedente (1940) ao tratar de *Temnocephala brevicornis*. Essa sub-espécie foi colocada acertadamente, por BAER, 1931, na sinonimia de *T. brevicornis*. Cabe, contudo, a MERTON, o mérito de ter tornado melhor conhecida a anatomia no material por ele estudado.

Temnocephala brevicornis MONTICELLI, 1889

Sinônimo: *Temnocephala brevicornis intermedia* MERTON, 1922

Desta espécie tivemos oportunidade de fazer um estudo cuidadoso em trabalho anterior (1940), pelo que nos dispensamos de outros comentários a não ser citar seus hospedeiros e distribuição geográfica.

Localização: sôbre o plastrão e a pele das regiões axilar, inguinal e anal.

Hospedeiros:

Hydromedusa maximiliani (MIKAN)

Procedência: Terezopolis, Rezende e Angra dos Reis (Estado do Rio de Janeiro) e Viçosa (Estado de Minas Gerais) — Brasil.

Hydromedusa tectifera COPE

Procedência: São Paulo (Estado de São Paulo) — Brasil.

Mesoclemmys gibba (SCHW.) (= *Hydraspis gibba* SCHW.)

Procedência: Brasil (segundo MONTICELLI, 1899)

Platemys radiolata (MIKAN) (= *Hydraspis radiolata* MIKAN)

Procedência: Brasil (segundo MONTICELLI, 1889 e HASWELL, 1893).

TEMNOCÉFALOS DE MOLUSCOS

HASWELL descreveu *Temnocephala jheringi* HASWELL, 1893, da cavidade paleal de *Ampullaria* sp., sem contudo precisar a proveniência do material, apenas indicando vagamente o Brasil. Foi, do grupo, a primeira espécie descrita de moluscos. Sua descrição é bastante falha, não permitindo diagnose. Tivemos oportunidade de colher abundante material de *Ampullarius lineatus* em Mato Grosso. A primeira coleta foi feita em fevereiro e março de 1940 na localidade de Salobra e proximidades; contudo, poucos exemplares apresentaram temnocéfalos. Em fevereiro de 1941 colhemos grande número de *Ampullarius lineatus* nas localidades de Salobra, Guaicurús e Porto Esperança (Estado de Mato Grosso - Brasil); entretanto os exemplares de Salobra e Porto Esperança apresentaram-se livres de temnocéfalos, ao passo que todos os exemplares desse molusco colhidos em Guaicurús abrigavam numerosos temnocéfalos. Sendo o único material desse grupo que conseguimos em moluscos brasileiros de água doce, e como HASWELL não indica com maior precisão a proveniência

de seu material, resolvemos considerá-lo como sendo *Temnocephala jheringi* HASWELL, 1893, apesar de seus caracteres não concordarem, em certos pontos, com os da descrição original de HASWELL. Assim, êste autor nega a presença de olhos e de pigmento, o que está em desacordo com o que se observa no material por nós conseguido; como já tivemos oportunidade de referir, em trabalho anterior sobre *Temnocephala brevicornis* MONTICELLI, 1889, o pigmento dos olhos desaparece após a fixação do animal, e nessas condições tais orgãos só se evidenciam em cortes histológicos; por conseguinte, a atribuida ausência de olhos em *T. jheringi* parece-nos dever ser considerada como simples deficiência técnica no exame do material, o que fica reforçado pelo fato de todas as espécies deste gênero, por nós examinadas, a fresco e em cortes histológicos, terem demonstrado a presença de olhos, sempre do mesmo tipo fundamental do de *T. brevicornis*. Na descrição de HASWELL, ainda é assinalada, como carater da espécie, a ausência da vesícula seminal (= vesícula seminal externa) no aparelho genital masculino, o que tambem foi verificado não ser real para o material que estudamos; atribuimos esse falso carater a uma imperfeição de técnica e observação, uma vez que em todos os temnocéfalos brasileiros, por nós estudados, a vesícula seminal é constante; assim sendo, os canais deferentes desembocam na vesícula seminal e não na glândula vesiculosa (= vesícula seminal interna) como se encontra na descrição de HASWELL.

Temnocephala jheringi HASWELL, 1893

MORFOLOGIA EXTERNA: corpo de contorno elíptico alongado. Comprimento: 2,40 - 3,48 mm e largura máxima equatorial: 1,10 - 1,85 mm. Apêndices digitiformes anteriores curtos. Para o apêndice mediano o comprimento oscilou entre 0,16 e 0,38 mm. Acetábulo subterminal, grande e raso, pedunculado, de contorno circular com diâmetro de 0,49 - 0,70 mm.

APARELHO DIGESTIVO: boca ventral, pequena, circular, mais ou menos na união do quinto anterior com os quatro quintos posteriores. Faringe alongado, medindo 0,38 - 0,60 mm de comprimento por 0,28 - 0,43 mm de largura, com esfincter anterior muito pequeno e posterior bastante desenvolvido. Saco intestinal amplo e septado.

APARELHO GENITAL ♂: testículos em número de quatro, elipsoidais ou grosseiramente globoides, situados no terço posterior do corpo, cada par com zonas coincidentes e campos afastados; os campos testiculares anteriores são em grande parte coincidentes com os campos testiculares posteriores correspondentes. Os testículos posteriores são consideravelmente mais volumosos que os anteriores. Os testículos anteriores medem 0,18 - 0,30 mm de comprimento por 0,16 - 0,24 mm de largura e os posteriores 0,30 - 0,42 mm de comprimento por 0,20 - 0,34 mm de largura. Cada testículo anterior une-se ao posterior do mesmo lado por meio de um ducto intertesticular curto e delgado. Canais deferentes partem da face medial

dos testículos posteriores correspondentes e dirigem-se à vesícula seminal, dilatando-se em ampola em sua extremidade distal, sendo o da direita mais longo que o da esquerda. Vesícula seminal piriforme, alongada, medindo 0,26 - 0,38 mm de comprimento por 0,06 - 0,07 mm de maior largura, em sua parte basal. Glândula vesiculosa grande, elipsoidal, com 0,22 - 0,24 mm de comprimento e 0,12 - 0,16 mm de largura. Cirro quitinoso, em forma de cone curto e bastante alargado na base; sua extremidade distal é ligeiramente dilatada e apresenta uma corôa de espinhos longos e muito evidentes, que se adelgaçam da base de implantação para a extremidade livre. Esses espinhos são sempre em pequeno número e muito evidentes. Mede 0,16 - 0,18 mm de comprimento.

APARELHO GENITAL ♀ : ovário relativamente grande, mais ou menos esferoidal, com diâmetro de 0,12 - 0,26 mm. Oviducto curto. Metratermo longo e musculoso. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios com folículos vitelínicos dispostos à maneira de rede anastomótica que envolve o saco intestinal. Vesícula reabsorvente volumosa, esferoidal, com diâmetro de 0,24 - 0,40 mm, tendo logo abaixo quatro receptáculos seminais pequenos, elipsoidais, bastante evidentes, medindo 0,029 - 0,033 mm de comprimento por 0,020 - 0,025 mm de largura. Ovos elipsoidais, pequenos e pedunculados.

Hospedeiro: *Ampullarius lineatus* SPIX

Localização: cavidade paleal e columela

Procedência: Salobra e Guaicurús (Estado de Mato Grosso) — Brasil.

TEMNOCÉFALOS DE CRUSTÁCEOS

(DECAPODA. BRACHYURA)

Neste grupo havia duas espécies descritas de temnocéfalos brasileiros: *Temnocephala microdactyla* MONTICELLI, 1903 e *Temnocephala lutzi* MONTICELLI, 1913. A primeira foi encontrada em *Trichodactylus (Dilocarcinus) orbicularis* (MENSCHEN), de Mato Grosso, e a segunda, de São Paulo, estava assinalada em *Telphusa* sp.. A respeito deste último hospedeiro, porém, BAER, 1931, baseado na distribuição geográfica de *Potamon* (= *Telphusa*), gênero não americano, chegou à conclusão de tratar-se de crustáceo determinado erroneamente.

As descrições dadas por MONTICELLI são, porém, muito deficientes, não frizando os caracteres específicos, em particular o aparelho copulador masculino. Tomamos por norma, então, redescrever as espécies acima citadas com material obtido respetivamente de Mato Grosso e São Paulo. Em Mato Grosso conseguimos por duas vezes, em 10-III-1940 e em 1-II-1941, abundante material de temnocéfalos na localidade de Bodoquena, sobre *Trichodactylus (Dilocarcinus) pictus* M. EDW., no qual se baseou nossa redescrição, e que consideramos como *Temnocephala microdactyla* MONTICELLI, 1903. Em São Paulo obtivemos abundante material sobre grande número de exemplares de *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI, apanhados principalmente em Pinheiros na capital do Estado e na cidade de Piracicaba



Fig. 5 - *T. jheringi:* Total, em toto-montagem. Fig. 6 - *Idem* - Complexo genital, em toto-montagem. Fig. 7 - *T. microdactyla:* Total, em toto-montagem. Fig. 8 - *Idem* - Complexo genital, em toto-montagem.

(Estado de São Paulo); nele baseamos nossa redescrição, considerando-o como *Temnocephala lutzi* MONTICELLI, 1913. Mais tarde, por especial obséquio do Dr. LAURO TRAVASSOS FILHO, conseguimos novo material de temnocéfalos vivendo sobre *Trichodactylus petropolitanus*, proveniente da Cantareira, na capital do Estado de São Paulo, e que revelou ser nitidamente diferente de *Temnocephala lutzi*, bem como das outras espécies, pelo que consideramos nova espécie, denominando-a *Temnocephala travassosfilhoi* n. sp., cuja descrição daremos mais adiante. Um de nós (R. C.) teve oportunidade de conseguir novo material de temnocéfalos sobre *Trichodactylus* sp., na Fazenda Poço Grande, de propriedade do Snr. FRANCISCO LANE, na localidade de Juquiá, no Estado de São Paulo, que tambem revelou caracteres específicos distintos, permitindo separá-la facilmente das outras espécies, à qual damos o nome de *Temnocephala lanei* n. sp.

Temnocephala microdactyla MONTICELLI, 1903

MORFOLOGIA EXTERNA: contorno elíptico, bastante alongado. Comprimento de 2,50 a 3,50 mm e largura máxima equatorial de 1,20 a 1,50 mm. Apêndices digitiformes anteriores longos e muito extensiveis, medindo o mediano 0,30 - 0,50 mm. Acetábulo pequeno e pedunculado com diâmetro de 0,50 a 0,60 mm.

APARELHO DIGESTIVO: boca ventral, pequena, mais ou menos na união do quarto anterior com os três quartos posteriores, tendo diâmetro transverso de 0,03 a 0,04 mm. Faringe grande, globoide, com diâmetro de 0,50 a 0,60 mm, com esfincter anterior muito pequeno e o posterior bastante desenvolvido. Saco intestinal amplo e septado, como nos outros representantes do gênero.

APARELHO GENITAL ♂: testículos em número de quatro, sendo um par anterior e outro posterior, este sempre de dimensões consideravelmente mais avantajadas. Os testículos anteriores teem zonas coincidentes e os seus campos são coincidentes com os dos testículos posteriores correspondentes; são em geral elipsoidais alongados, tendo o par posterior ligeira inclinação de fora para dentro e de diante para trás, ao passo que os anteriores se dispõem no sentido do maior eixo do corpo. Os testículos anteriores medem 0,30 - 0,36 mm de comprimento por 0,12 - 0,20 mm de largura e os posteriores medem 0,32 - 0,48 mm de comprimento por 0,14 - 0,26 mm de largura. Cada testículo anterior é unido ao posterior do mesmo lado por meio de um ducto intertesticular curto e delgado. Canais deferentes partem da face medial do testículo posterior correspondente; de calibre uniforme e reduzido, tornam-se bulbosos em sua extremidade distal, junto à vesícula seminal, sendo o da direita mais longo que o da esquerda. Vesícula seminal piriforme, muito alongada, medindo 0,28 a 0,40 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura na parte basal. Glândula vesiculosa ovoidal, medindo 0,15 - 0,20 mm de comprimento por 0,08 - 0,09 mm de largura. Cirro quitinoso, longo e fino, arqueado, tendo a concavidade olhando para frente e para dentro; não apresenta estrutura com espículos quitinosos em sua porção distal. Mede de 0,33 a 0,36 mm de comprimento.

APARELHO GENITAL ♀: ovário pequeno e globoso, medindo 0,06 a 0,08 mm de diâmetro. Oviducto, curto. Metratermo longo, de paredes muito espessas, apresentando distalmente um poderoso esfincter terminal, provido internamente de uma estrutura quitinosa e dentilhada. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios, constituidos por folículos vitelínicos pouco numerosos e dispostos à maneira de rede anastomótica envolvendo o saco intestinal. Vesícula reabsorvente grande, mais ou menos esferoidal, com diâmetro de 0,16 a 0,20 mm. Ovos elipsoidais, pequenos e pedunculados.

Hospedeiro: *Trichodactylus (Dilocarcinus) pictus* M. EDW.

Localização: Juntas articulares, superfície do corpo e câmara aérea.

Procedência: Bodoquena (Estado de Mato Grosso) — Brasil.

Temnocephala lútzi MONTICELLI, 1913

MORFOLOGIA EXTERNA: contorno elíptico alargado. Comprimento de 2,29 a 2,95 mm e largura máxima equatorial de 1,36 a 1,80 mm. Apêndices anteriores digitiformes curtos, medindo o mediano 0,27 a 0,38 mm. Acetábulo subterminal, com pedúnculo curto, contorno circular e diâmetro de 0,44 a 0,56 mm.

APARELHO DIGESTIVO: boca ventral, pequena, na metade anterior do corpo, contorno circular e diâmetro de 0,04 a 0,08 mm. Faringe globoide, grande, ligeiramente mais largo que longo, medindo 0,40 - 0,50 mm de comprimento por 0,54 - 0,60 mm de largura, provido de um esfincter anterior pequeno e outro posterior, consideravelmente mais desenvolvido. Saco intestinal amplo e septado.

APARELHO GENITAL ♂: testículos em número de quatro, um par anterior e outro posterior, relativamente volumosos, situados na metade posterior do corpo; as zonas testiculares opostas são coincidentes e os campos testiculares anteriores são parcialmente coincidentes com os posteriores do mesmo lado, por se encontrarem os testículos anteriores um tanto mais lateralmente que os posteriores. Os testículos posteriores apresentam ligeira inclinação, tendo o maior eixo dirigido de diante para trás e de fora para dentro. São de forma variavel, mas geralmente elipsoidais. Os testículos anteriores medem 0,28 - 0,44 mm de comprimento por 0,12 - 0,26 mm de largura e os posteriores 0,28 - 0,56 mm de comprimento por 0,22 - 0,38 mm de largura. Cada testículo anterior está unido ao posterior correspondente por meio de um ducto intertesticular curto e delgado. Canais deferentes partindo da face medial do testículo posterior correspondente, delgados e longos, tendo a extremidade distal dilatada em ampola, sendo o da direita mais longo que o da esquerda. Vesícula seminal piriforme, alongada, com comprimento de 0,14 a 0,18 mm e largura máxima basal de 0,06 a 0,08 mm. Glândula vesiculosa pequena, elipsoidal, tendo 0,10 - 0,15 mm de comprimento por 0,07 - 0,09 mm de largura. Cirro quitinoso, curto, encurvado aproximadamente em ângulo reto na sua extremidade distal, apresentando, assim, duas porções: uma longa, transversa e outra curta, vertical. Na extremidade distal apresenta uma corôa de pequenos espinhos quitinosos, muito delicados. Mede 0,13 a 0,14 mm de comprimento total.

APARELHO GENITAL ♀: ovário muito pequeno, globoide, com diâmetro de 0,04 a 0,07 mm. Oviducto muito curto. Metratermo muito longo e de paredes bastante espessadas. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios consti-

tuidos por folículos mais ou menos volumosos e dispostos em rede anastomótica que envolve o saco intestinal. Vesícula reabsorvente semi-esférica, com 0,08 - 0,12 mm de altura por 0,14 a 0,16 mm de maior largura.

Hospedeiro: *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI

Localização: Juntas articulares, superfície do corpo e câmara aérea.

Procedência: São Paulo (Pinheiros) e Piracicaba (Estado de São Paulo) — Brasil.

Temnocephala travassosfilhoi n. sp.

MORFOLOGIA EXTERNA: * corpo de contorno elíptico muito alargado, de modo a haver apenas ligeira predominância do eixo ântero-posterior sobre o diâmetro transverso. Comprimento de 1,70 a 1,96 mm e largura máxima equatorial de 1,50 a 1,70 mm. Apêndices digitiformes anteriores, muito curtos, oscilando o comprimento do mediano entre 0,22 e 0,25 mm. Acetábulo subterminal, pequeno, pedunculado, de contorno circular, com diâmetro de 0,40 a 0,44 mm.

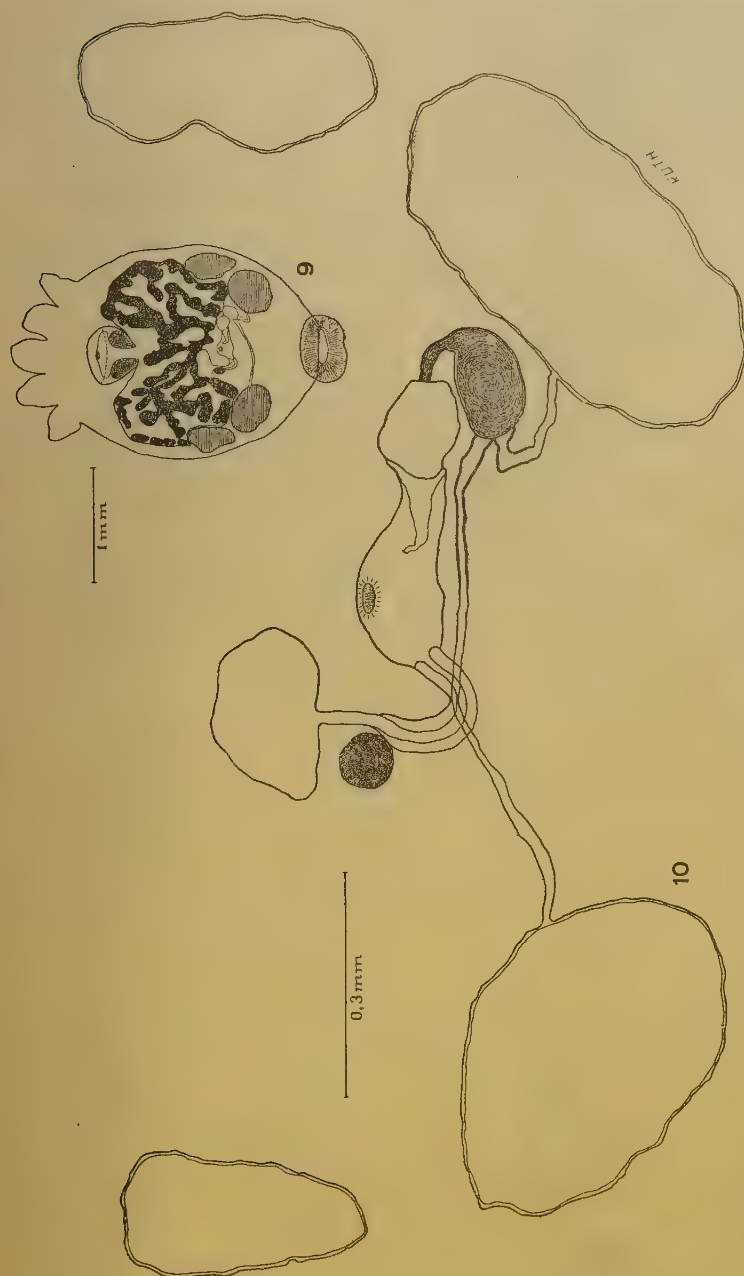
APARELHO DIGESTIVO: boca ventral, pequena, na união do quarto anterior com os três quartos posteriores. Faringe globoide ou ligeiramente achatado no sentido ântero-posterior, com diâmetro de 0,43 a 0,45 mm, provido de um esfincter anterior pouco desenvolvido e outro posterior grande. Saco intestinal amplo e septado.

APARELHO GENITAL ♂: testículos em número de quatro, na metade posterior do corpo. Os testículos de cada lado estão muito próximos, ficando o anterior um tanto para fora e para frente do posterior, de modo que as zonas testiculares anteriores coincidem, acontecendo tambem o mesmo com as zonas testiculares posteriores, do que resulta superposição parcial das duas zonas; os campos testiculares anteriores são em parte coincidentes com os posteriores do mesmo lado. Os testículos anteriores são pequenos e de forma elipsoidal alongada e os posteriores são maiores e mais ou menos globoides. Os testículos anteriores medem 0,18 - 0,25 mm de comprimento por 0,10 - 0,14 mm de largura, medindo os posteriores 0,20 - 0,25 mm de comprimento por 0,18 - 0,22 mm de largura. Cada testículo anterior é posto em comunicação com o posterior do mesmo lado por meio de um ducto intertesticular delgado e extremamente curto. Canais deferentes de diâmetro reduzido, bulbosos em sua extremidade distal, partem da face medial do testículo posterior correspondente, abrindo-se independentemente na vesícula seminal, sendo o da direita bastante mais longo que o da esquerda. Vesícula seminal piriforme, muito longa e delgada, tendo 0,28 - 0,37 mm de comprimento por 0,06 - 0,07 mm de largura na parte basal. Glândula vesiculosa grande elipsoidal, dirigida de fora para dentro e de diante para trás, com 0,26 - 0,30 mm de comprimento por 0,10 - 0,12 mm de largura. Cirro quitinoso, grande, bastante alargado na base, apresenta-se encurvado em foice, tendo na extremidade distal uma corôa de espinhos quitinosos muito longos e de diferentes tamanhos, dispostos de modo a lembrar uma flâmula. Mede 0,40 mm de comprimento.

APARELHO GENITAL ♀: ovário muito pequeno, globoide, situado na união dos dois terços anteriores com o terço posterior, junto à vesícula reabsor-

---

* Descrição baseada em seis exemplares.



T. lutzi: Fig. 9 - Total, em toto-montagem. Fig. 10 - Complexo genital em toto-montagem.

vente, com 0,07 - 0,08 mm de diâmetro. Oviducto curto. Metratermo longo, ligeiramente encurvado para dentro, com paredes um tanto espessas. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios constituidos por folículos volumosos, dispostos em rede anastomótica envolvendo o saco intestinal. Vesícula reabsorvente grande, semi-esférica, com 0,12 a 0,16 mm de altura e 0,22 a 0,25 mm de largura. Ovos elipsoidais, pequenos e pedunculados.

Esta espécie é dedicada ao Dr. LAURO TRAVASSOS FILHO, que muito nos tem auxiliado na coleta de material helmintológico.

Hospedeiro: *Trichodactylus petropolitanus* GOELDI

Localização: Juntas articulares, superfície do corpo e câmara aérea.

Procedência: São Paulo (Cantareira) e S. Bernardo (Estado de São Paulo) — Brasil.

Temnocephala lanei n. sp.

MORFOLOGIA EXTERNA: * contorno aproximadamente elíptico. Comprimento de 2,70 a 3,27 mm; largura máxima equatorial de 1,80 a 1,91 mm. Apêndices anteriores digitiformes, de comprimento muito variavel, oscilando para o mediano entre 0,32 e 0,65 mm. Acetábulo muito pequeno e subterminal com diâmetro de 0,40 a 0,46 mm.

APARELHO DIGESTIVO: boca pequena, ventral, de contorno circular, situada na metade anterior do corpo. Faringe elipsoide, de maior eixo transverso, musculoso, grande, provido de esfincter anterior pequeno e posterior bastante desenvolvido; mede 0,46 a 0,50 mm de altura por 0,65 a 0,71 mm de largura. Saco intestinal amplo e septado.

APARELHO GENITAL ♂: testículos, em número de quatro, na metade posterior do corpo, globoides, relativamente pequenos, tendo as zonas opostas totalmente coincidentes e os campos afastados. Os campos testiculares anteriores são em grande parte coincidentes com os posteriores de cada lado. Os testículos anteriores medem 0,18 - 0,20 mm de comprimento por 0,16 - 0,18 mm de largura e os posteriores 0,22 - 0,26 mm de comprimento por 0,22 - 0,24 mm de largura. Cada testículo anterior é unido ao posterior do mesmo lado por intermédio de um ducto intertesticular curto e delgado. Canais deferentes longos e delgados, tendo a extremidade distal ligeiramente dilatada em ampola, antes de sua abertura na vesícula seminal; partem da face medial dos testículos posteriores correspondentes, sendo o da direita mais longo que o da esquerda. Vesícula seminal piriforme, longa e delgada, medindo 0,22 - 0,24 mm de comprimento por 0,06 - 0,07 mm de maior largura. Glândula vesiculosa pequena, elipsoidal, com 0,13 - 0,15 mm de comprimento por 0,07 - 0,08 mm de largura. Cirro curto e fino, quitinoso, cônico, apresentando na extremidade distal uma corôa de espinhos quitinosos muito pequenos e finos. Mede 0,12 mm de comprimento.

APARELHO GENITAL ♀: ovário pequeno e globoso, com 0,08 - 0,09 mm de diâmetro. Oviducto curto. Metratermo longo e encurvado. Anexos ao aparelho genital feminino: vitelogênios constituidos por folículos volumosos, formando uma grande rede anastomótica que envolve o saco intestinal. Vesícula reabsorvente com forma aproximada de calota esférica, medindo 0,18 - 0,21 mm de altura e 0,28 - 0,31 mm de maior largura. Ovos pequenos, elipsoidais e pedunculados.

---

* Descrição baseada em oito exemplares.



Figs. 11 e 12 - *T. travassosfilhoi:* Total, em toto-montagem. Fig. 13 - *Idem* - Complexo genital, em toto-montagem. Figs. 14 e 15 - *T. lanei:* Total, em toto-montagem. Fig. 16 - *Idem* - Complexo genital, em toto-montagem.

Esta espécie é dedicada ao Snr. Francisco Lane, proprietário da Fazenda Poço Grande, em Juquiá.

Hospedeiro: *Trichodactylus* sp.

Localização: Juntas articulares, superfície do corpo e câmara aérea.

Procedência: Juquiá (Estado de São Paulo) — Brasil.

DIAGNOSE DIFERENCIAL

Verificamos que todos os caracteres dos representantes deste grupo são extremamente precários para uma boa separação de espécies, com excepção do aparelho copulador masculino que, além de ter dimensões pouco variaveis, apresenta-se sempre com a mesma forma, característica para cada espécie. As dimensões do corpo são igualmente de pouco valor, em geral, variando bastante o tamanho dentro da mesma espécie e sendo mais ou menos da mesma ordem nas várias espécies do gênero; contudo, grosseiramente, as espécies estudadas podem ser divididas em tres grupos: 1.º) representantes de grande talhe, constituidos por *Temnocephala brevicornis*, que atinge as maiores dimensões (5,50 mm.); 2.º) representantes de porte médio, onde estão *T. microdactyla* (2,50 - 3,50 mm.), *T. jheringi* (2,40 - 3,48 mm.) e *T. lanei* (2,70 - 3,27 mm.) e 3.º) representantes de pequeno talhe, onde incluimos *T. lutzi* (2,29 - 2,95 mm.) e *T. travassosfilhoi* (1,70 - 1,96 mm.).

TABELA DE MEDIDAS (em milímetros)

		T. brevicornis	*T. microdactyla*	*T. lutzi*	*T. travassosfilhoi*	*T. lanei*	*T. jheringi*
Comprimento total		2,62-5,50	2,50-3,50	2,29-2,95	1,70-1,96	2,70-3,27	2,40-3,48
Largura máxima		1,70-2,62	1,20-1,50	1,36-1,80	1,50-1,70	1,80-1,91	1,10-1,85
Acetábulo (diâmetro)		0,80-1,20	0,50-0,60	0,44-0,56	0,40-0,44	0,40-0,46	0,49-0,70
Faringe	Comprimento	0,51-0,82	0,50-0,60	0,40-0,50	0,43-0,45	0,46-0,50	0,38-0,60
	Lagura	0,53-0,87	0,50-0,60	0,54-,060	0,43-0,45	0,65-0,71	0,28-0,43
Testiculo anterior	Comprimento	0,22-0,49	0,30-0,36	0,28-0,44	0,18-0,25	0,18-0,20	0,18-0,30
	Largura	0,16-0,28	0,12-0,20	0,12-0,26	0,10-0,14	0,16-0,18	0,16-0,24
Testiculo posterior	Comprimento	0,28-0,59	0,35-0,48	0,28-0,56	0,20-0,25	0,22-0,26	0,30-0,42
	Largura	0,20-0,40	0,14-0,26	0,22-0,38	0,18-0,22	0,22-0,24	0,20 0'34
Vesicula seminal	Comprimento	0,34	0,28-0,40	0,14-0,18	0,28-0,37	0,22-0,24	0,26-0,38
	Largura	0,08	0,05-0,07	0,06-0,08	0,06-0,07	0,06-0,07	0,06-0,07
Glândula vesiculosa	Comprimento	0,20	0,15-0,20	0,10-0,15	0,26-0,30	0,13-0,15	0,22-0,24
	Largura	0,12	0,08-0,09	0,07-0,09	0,10-0,12	0,07-0,08	0,12-0,16
Cirro (comprimento)		0,36	0,33-0,36	0,13-0,14	0,40	0,12	0,16-0,18
Ovário (diâmetro)		0,15	0,06-0,08	0,04-0,07	0,07-0,08	0,08-0,09	0,12-0,26

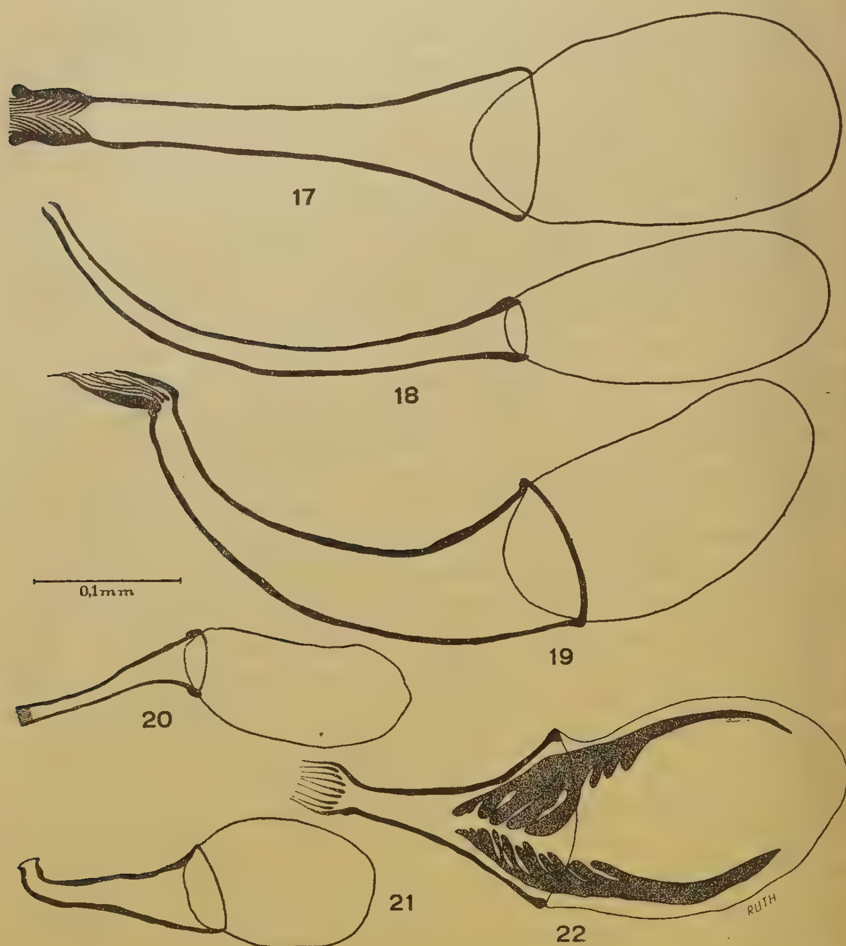
O diâmetro do acetábulo tambem é um caracter fraco para ser tomado isoladamente; verificamos que ainda em *T. brevicornis* seu valor absoluto é maior (0,80 - 1,20 mm). Nas outras espécies é mais ou menos da mesma ordem de tamanho, indo de 0,40 a 0,70 mm; relativamente, porem, seu valor é mais avantajado em espécies de pequeno porte como *T. travassosfilhoi* que, sendo a menor espécie brasileira por nós estudada, apresenta acetábulo grosseiramente da mesma ordem de tamanho que o das outras espécies. O faringe tambem não apresenta maior interesse, sendo sua forma variavel, ora globoide, ora elipsoide, dentro de uma mesma espécie, além de serem suas dimensões, de um modo geral, da mesma ordem em todas as espécies. As maiores medidas deste orgão foram encontradas em *T. brevicornis* (0,82 mm x 0,87 mm) e as menores em *T. jheringi* (0,38 mm x 0,28 mm).

Do aparelho genital feminino, tambem pouca coisa se consegue. O ovário é em geral muito pequeno, indo de 0,06 - 0,09 mm de diâmetro em *T. microdactyla, T. lutzi, T. travassosfilhoi* e *T. lanei;* mede cerca de 0,15 mm em *T. brevicornis* e atinge as maiores proporções em *T. jheringi,* em que oscilou de 0,12 a 0,26 mm. O metratermo se distingue em *T. lutzi* e *T. microdactyla* pela consideravel espessura de suas paredes e, particularmente na última espécie, na qual é provido distalmente de um poderoso esfincter terminal, que apresenta, internamente, uma camada quitinosa espessa e dentilhada.

Do aparelho genital masculino, os testículos, quer pela forma, posição ou dimensões, pouco esclarecem a diagnose específica. Eles atingem as maiores proporções em *T. brevicornis, T. microdactyla, T. lutzi* e *T. jheringi* e as menores em *T. travassosfilhoi* e *T. lanei.* Quanto à situação, distinguem-se dois grupos, o primeiro em que os testículos anteriores atingem um limite mais próximo do eixo equatorial do corpo e por isso entram em contato mais franco com as faces laterais do saco intestinal, incluindo-se neste grupo *T. microdactyla* e *T. lutzi,* e o segundo, em que os testículos anteriores estão colocados mais posteriormente e, por conseguinte, suas relações com o saco intestinal se restringem mais à face posterior deste orgão; neste grupo encontram-se *T. brevicornis, T. jheringi, T. travassosfilhoi* e *T. lanei.*

De todos os caracteres, porém, é o cirro o mais característico e o que por si só nos permite firmar diagnóstico seguro. Quanto às suas dimensões, podemos distinguir dois grupos: um de cirro curto, indo de 0,12 a 0,18 mm, onde incluimos *T. lanei* (0,12 mm), *T. lutzi* (0,13 - 0,14 mm) e *T. jheringi* (0,16 - 0,18 mm); outro de cirro longo, indo de 0,33 a 0,40 mm, onde se encontram *T. microdactyla* (0,33 - 0,36 mm), *T. brevicornis* (0,36 mm) e *T. travassosfilhoi* (0,40 mm).

Esta diferença de dimensões é ainda mais acentuada quando relacionada ao porte do corpo, pois *T. jheringi*, que apresenta grandes dimensões do corpo (2,40 - 3,48 mm), é a espécie que tem cirro dos mais



Cirros: Fig. 17: *T. brevicornis*. Fig. 18: *T. microdactyla*. Fig. 19: *T. travassosfilhoi*. Fig. 20: *T. lanei*. Fig. 21: *T. lutzi*. Fig. 22: *T. jheringi*.

curtos (0,16 - 0,18 mm), ao passo que o cirro mais longo (0,40 mm) fomos encontrar em *T. travassosfilhoi* que é o representante de menores dimensões do corpo (1,70 - 1,96 mm). A forma do cirro é característica para cada espécie:

1 — *T. brevicornis:* em forma de cone muito alongado. Em sua extremidade distal se dilata em ampola, onde apresenta uma corôa interna de espículos, constituida por várias fileiras longitudinais de pequenos espinhos superpostos e com direção oblíqua, tendo as pontas voltadas para a abertura distal do cirro. Mede 0,36 mm de comprimento.

2 — *T. microdactyla:* muito longo e bastante fino, arqueado em foice, com a concavidade olhando para frente e para dentro, não apresenta extrutura distal de espinhos quitinosos; sua extremidade livre é ligeiramente bulbosa. Mede 0,33 - 0,36 mm de comprimento.

3 — *T. lutzi:* curto, encurvado mais ou menos em ângulo reto em sua extremidade distal, apresentando, assim, duas porções, uma transversa longa e outra vertical curta. A extremidade distal é provida de uma corôa de pequenos espinhos quitinosos. Mede 0,13 a 0,14 mm de comprimento.

4 — *T. travassosfilhoi:* muito longo e bastante alargado na base, apresenta-se encurvado em foice, tendo na extremidade distal, ligeiramente dilatada, uma corôa de espinhos quitinosos longos e de diferentes tamanhos, dispostos de maneira a lembrar uma flâmula. Mede 0,40 mm de comprimento.

5 — *T. lanei:* muito curto e bastante fino, cônico, provido na extremidade distal de uma corôa de espinhos pequenos e muito delicados. Mede 0,12 mm de comprimento.

6 — *T. jheringi:* cônico, curto e muito alargado na base, tendo a extremidade distal ligeiramente bulbosa e provida de uma corôa simples de espinhos quitinosos longos e em pequeno número. Os espinhos são bastante evidentes, longos, tendo a base de implantação mais dilatada que a extremidade livre. Mede 0,16 - 0,18 mm de comprimento.

STUDIES ON *TEMNOCEPHALIDAE* MONTICELLI, 1899, WITH ESTABLISHMENT OF TWO AUSTRALIAN NEW GENERA AND DESCRIPTION OF TWO NEOTROPICAL NEW SPECIES

Abstract

This paper presents a brief digest of the history of the Temnocephalidae MONTICELLI, *1899 and a discussion of its genera. Temnomonticellia n. g., type-species T. quadricornis* (HASWELL, *1887) and Temnohaswellia n. g., type-species T. novae-zelandiae* (HASWELL, *1887) are established. The diagnose, a list of species, the general morphology with special reference to the signification of "vesicula resorbiens" and the criterion for species are also presented for Temnocephala* BLANCHARD, *1849. T.*

microdactyla MONTICELLI, *1903, T. lutzi* MONTICELLI, *1913 and T. jheringi* HASWELL, *1893 are redescribed. T. travassosfilhoi n. sp., from Trichodactylus petropolitanus* GOELDI *and T. lanei n. sp., from Trichodactylus sp. are described.*

BIBLIOGRAFIA

BAER, J. G. — 1929 — Contribution à l'étude des Temnocéphales. Dactylocephala madagascariensis (Vayssière, 1892). *Bull. Biol. France et Belgique.* 63, 540-561.

BAER, J. G. — 1931 — Étude monographique du groupe des temnocephales. *Bull. Biol. France et Belgique.* 65, 1-57.

BLANCHARD, E. — 1849 — Second mémoire sur l'organisation des malacobdelles (groupe de sous-embrachement des Vers). *Ann. d. Sc. Nat. Par. Zool.* 3.ª ser. 12 (nov.), 267-276.

BRAUN, M. — 1890 — Vermes. *Bronn's Klass. u. Ordnung d. Thier-Reichs.* Leipzig, 499, 525, 547, 549 e 552.

GOELDI, E. — 1894 — Breve noticia acerca de alguns vermes interessantes do Brasil. IV- Trematodes. *Bol. do Mus. Paraense de Hist. Nat. e Ethn.* 1, 42-43.

HASWELL, W. A. — 1887 — On Temnocephala, an aberrant monogenetic trematode. *Quart. Journ. Micr. Sc. London,* n. ser. (110). 28, 279-302.

HASWELL, W. A. — 1892 — On the excretory system of Temnocephala. *Zool. Anz.* 15, 149-151.

HASWELL, W. A. — 1892 — Notes on the minute structure of the integument of Temnocephala. *Zool. Anz.* 15, 360-362.

HASWELL, W. A. — 1892 — On the systematic position and relationships of the Temnocephaleae. *Abhandl. d. Naturforsch. Gesellsch. zu Halle.* 17, 457-460.

HASWELL, W. A. — 1893 — A monograph of the Temnocephaleae. Macleay Memorial Volume. *Linn. Soc. N. S. W.* Sidney, 93-152.

HASWELL, W. A. — 1893 — A new genus of the Temnocephala. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 7, 342.

HASWELL, W. A. — 1900 — Supplement to a Monograph of the Temnocephaleae. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 25, 430-435.

HASWELL, W. A. — 1924 — Critical notes on the Temnocephaloidea. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* 49, 509-520.

HETT, M. L. — 1925 — On a new species of Temnocephala (T. chaeropsis) (Trematoda) from West Australia. *Proc. Zool. Soc. London.* 569-575.

MERTON, H. — 1913 — Die weiblichen Geschlechtsorgane von Temnocephala. *Zool. Anz.* 41, 413-421.

MERTON, H. — 1913 — Beiträge zur Anatomie und Histologie von Temnocephala. *Abhandl. Senckenberg. Naturfor. Gesell.* 35, 1-58.

MERTON, H. — 1922 — Neue Beiträge zur Anatomie von Temnocephala. *Zool. Jahrb. Anat.* 43, 539-556.

MONTICELLI, F. S. — 1889 — Di una nuova specie del genere Temnocephala Blanch. ectoparassita dei cheloniani. 4 páginas.

MONTICELLI, F. S. — 1898 — Sulla Temnocephala brevicornis MONT., 1889 e sulle temnocefale in generale. *Boll. Soc. di Nat. Napoli.* 12, 72-127.

MONTICELLI, F. S. — 1902 — Temnocephala digitata n. sp.. *Boll. Soc. Nat. Napoli.* 1.ª ser. 16, 309.

MONTICELLI, F. S. — 1903 — Temnocephala microdactyla n. sp.. *Boll. Mus. Zool. Anat. comp. della R. Univ. Torino.* 18, 1-3.

MONTICELLI, F. S. — 1913 — Brevi communicazioni sulle Temnocefale. *Boll. Soc. Nat. Napoli.* ser. 3. 26, 7-8.

MONTICELLI, F. S. — 1914 — Di alcuni pretese forme del gruppo delle Temnocephale e nota critica sull'ordine dei Dactyloda. *Rend. Accad. Sc. Fis. Math.*, sér. 3. 20, 285-293.

MOQUIN-TANDON, A. — 1846 — Monographie de la famille des hirudinées. Nouvelle édition revue et augmentée. 448 páginas, 8.º, Paris.

MRAZECK, A. — 1907 — Ein europäischer Vertreter der Gruppe Temnocephaloidea. *Sitzungsber. Köngl. Böhm. Gesell. Wiss.* Prague. 36, 1-7.

PEREIRA, C. & R. CUOCOLO — 1940 — Contribuição para o conhecimento da morfologia, bionomia e ecologia de Temnocephala brevicornis MONTICELLI, 1889. *Arqu. Inst. Biol.* São Paulo. 11, 367-398.

PLATE, L. — 1914 — Über zwei ceylonische Temnocephaliden. *Jen. Zeitschr. f. Naturwiss.* 51, 707-722.

SEMPER, E. — 1872 — Zoologische Aphorismen II. Ueber die Gattung Temnocephala. *Zeitschr. f. Wiss. Zool.* 22, 307-310.

VAYSSIÈRE, A. — 1892 — Sur un nouveau Temnocephala parasite de l'Astacoides madagascariensis. *C. r. Acad. Sc. Paris.* 115 (1), 64-65.

VAYSSIÈRE, A. — 1892 — Étude sur Temnocephala, parasite de d'Astacoides madagascariensis. *Ann. Fac. Sc. Marseille.* 2, 77-79.

VAYSSIÈRE, A. — 1898 — Description du Temnocephala mexicana nov. sp. *Ann. Fac. Sc. Marseille.* 8, 227-235.

WACKE, K. F. R. — 1902 — Beiträge zur Kenntniss der Temnocephalen (Temnocephala chilensis, Temnocephala tumbesiana n. sp. und Temnocephala novae-zelandiae). Tese, 34 páginas, 8.º, Berlim.

WACKE, K. F. R. — 1903 — Beiträge zur Kenntniss der Temnocephalen (Temnocephala chilensis, Temnocephala tumbesiana n. sp. und Temnocephala novae-zelandiae). *Zool. Jahrb.* Jena, Supplement. 6, 1-116.

WEBER, M. — 1889 — Ueber Temnocephala Blanchard. *Zool. Ergeb. einer Reise in Niederländisch Ost-Indien.* (1), 1-20.

———o——— —

Vol. 12 — Art. 10 Novembro de 1941

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS MEMBRACÍDEOS NEOTRÓPICOS (IV)

POR

J. P. da Fonseca

Do Instituto Biologico de São Paulo

Com 12 figuras no texto

Na presente contribuição descrevemos seis novas espécies e uma subespecie de Membracídeos, do Brasil, sendo cinco espécies e uma subespecie provenientes de Belém, Estado do Pará, e uma de Santos (Guarujá), Estado de São Paulo.

Subfamilia *Membracinae*

Leioscyta neivai, n. sp.

Figs. 1 e 2

♀ — Fusca, acastanhada; dorso do pronoto quasi direito, sem depressão no meio; extremidade apical dos tegmina e uma faixa central, transversal, sôbre eles, amarelo-ferruginosas; superfície inferior do corpo e pernas, castanho-escuras; tarsos amarelo-ferruginosos.

Cabeça oblonga, castanho-escura, opaca, fina e densamente puncturada e pubescente; pubescência fina, serícea e fulvescente. Margem basal inteira, marginada na secção mediana. Vértice ligeiramente convexo, provido de numerosas rugas finas, longitudinais. Expansões genais levemente depressas, com a margem externa direita, metade apical ligeiramente quebrada, atenuada, provida de rugas finas, transversais, a extremidade apical angular, aguda, glabra e ligeiramente luzidia. Ocelos perfeitamente circulares, amarelo-claros, com brilho de ambar, mais próximos dos olhos e da margem basal da cabeça do que entre si; próximos aos ocelos, quasi junto à margem basal da cabeça, notam-se duas depressões longitudinais, caliginosas, ovais, glabras e opacas. Olhos castanho-escuros, proeminentes, ligeiramente oblongos. Clípeo triangular, mais longo do que largo, ligeiramente depresso no terço apical, tendo as margens, na metade basal, direitas, os ângulos laterais obtusos e a extremidade apical arredondada, marginada e provida de um feixe de pêlos sedosos e flavescente-claros.

Pronoto tão longo quanto o abdomen, castanho-escuro, fina e densamente puncturado, provido de pilosidade densa e fulvescente. Visto de perfil, o pronoto apresenta-se, na secção mediana, com a linha de contorno dorsal levemente sinuosa; na região anterior, sôbre o metopideo, em arco arredondado. Linha mediana saliente, no dorso do processo pronotal posterior em carena elevada, atenuada para as extremidades anterior e posterior. Nos lados do pronoto, entre os ângulos humerais e a linha mediana, notam-se três carenas longitudinais: a primeira bem desenvolvida, tão alta quanto a linha mediana, cortante, partindo da frente do metopídeo e terminando na altura da secção mediana do processo pronotal posterior; as duas seguintes curtas, baixas, levemente salientes e situadas entre os ângulos humerais e a primeira carena.

Ângulos humerais proeminentes, arredondados.

Processo pronotal posterior em declive atenuado para a parte posterior, a extremidade apical ponteaguda, tricarinada, ligeiramente curvada, não excedendo o abdomen, e tocando justo na altura da extremidade apical da quinta célula apical dos tegmina. No têrço apical do processo pronotal posterior, nota-se, em cada lado, uma carena curta, longitudinal, cortante, partindo do centro quasi junto às margens laterais, convergindo na extremidade apical do processo posterior; margem lateral direita, levemente arqueada junto à extremidade apical do processo posterior do pronoto.

Processo latero-anterior do pronoto envolvendo os olhos, ligeiramente constricto na secção mediana, dilatado na região apical, com as margens ântero-inferiores arredondadas.

Metopídeo vertical, apresentando, em cada lado, acima dos olhos, uma depressão caliginosa, glabra, luzidia e alargada no canto externo. Margem anterior do pronoto direita, francamente marginada junto aos olhos.

Tegmina duas vêzes mais longos do que largos, metade basal, região costal, e células basais 1 e 2, castanho-escuras, levemente puncturadas e pubescentes; margem costal ligeiramente arqueada; margem anal reta; têrço apical do limbo e metade das células apicais 1, 2 e 3, hialinos, com ligeira coloração amarelo-clara; sôbre o corio duas manchas transversais; uma anterior, abrangendo a costal e as células apicais e discoidais 1, 2 e 3, e outra sôbre a anal e basal. Duas células discoidais.

Pernas castanho-escuras, quasi negras; tíbias do segundo par mais alargadas do que as do primeiro par; tíbias do terceiro par providas de espinhos fortes e serrilhados; tarsos castanho-claros.

Asas hialinas, cinério-claras, com quatro células apicais e com nervuras pardo-escuras.

Comprimento total, da margem anterior do pronoto à extremidade dos tegminas, 6 mms.; comprimento do pronoto 5 mms.; largura entre os ângulos humerais 3 mms.

Cótipos (4 ♀♀), 2 na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, e 2 na coleção do autor.

Habitat: Praia das Tartarugas, Guarujá, São Paulo, Brasil. Coligidos por O. MONTE, 1940.

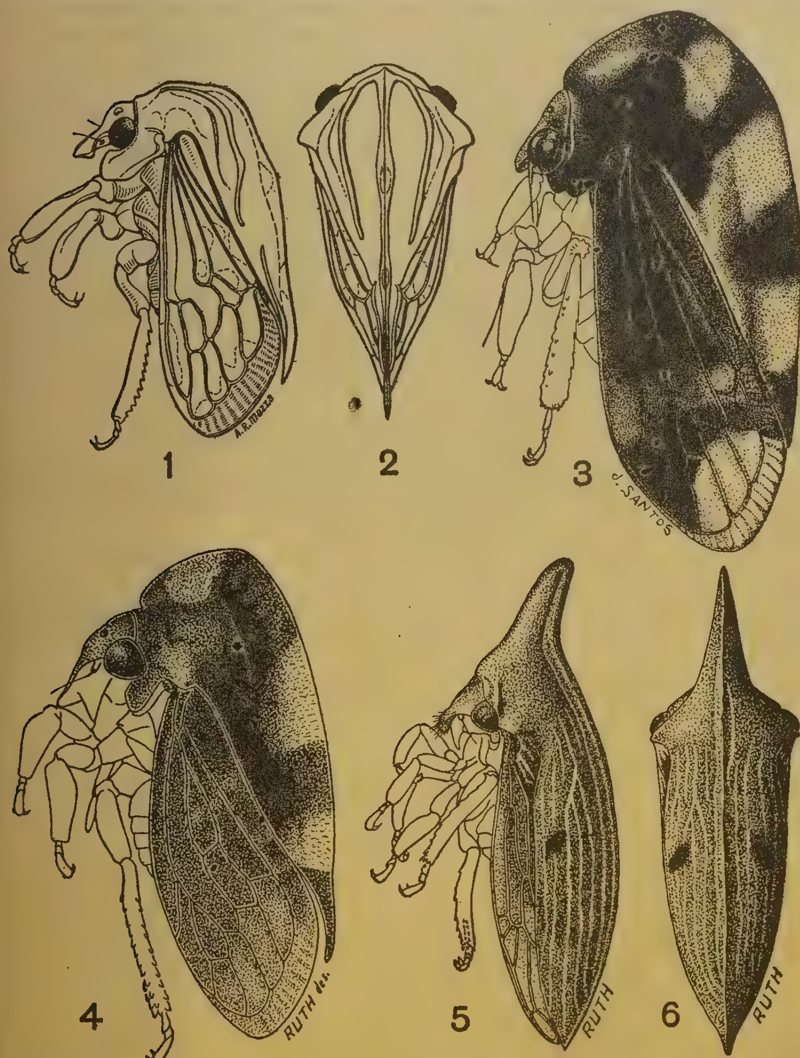
Esta espécie é próxima de *Leioscyta brunnea* FUNKHOUSER, da qual difere, porém, principalmente pelos seguintes caracteres: presença de três carenas laterais acima dos ângulos humerais; linha dorsal do pronoto mais reta; ausência de tubérculos sôbre os ocelos; coloração mais escura, quasi preta, e presença de duas manchas oblongas, amareladas, no dôrso do pronoto.

Dedicamos esta espécie ao nosso prezado amigo dr. ARTHUR NEIVA, eminente entomologista e cientista patricio, em homenagem ao seu 60.º aniversário natalício.

Leioscyta quadrimaculata, n. sp.

Fig. 3

♀ — Cabeça mais longa do que larga, ligeiramente convexa, finamente puncturada e pubescente, pilosidade curta, serícea, flavescente e luzidia. Olhos



Figs. 1 e 2 — *Leioscyta neivai*, n. sp. (aumento 10×). Fig. 3 — *Leioscyta quadrimaculata*, n. sp. (aum. 14×). Fig. 4 — *Erechtia trimaculata*, n. sp. (aum. 14×). Figs. 5 e 6 — *Polyrhyssa cultrata maculata*, nov. subsp. (aum. 10×).

grandes, globuliformes, castanho-escuros, manchados de pardo-claro. Ocelos diminutos, amarelo-claros, mais afastados entre si do que das margens laterais e superior da cabeça. Região frontal ligeiramente convexa. Sutura mediana percorrida por uma linha saliente. Expansões genais quasi tão largas quanto longas, ligeiramente sinuadas na margem externa, terminadas, posteriormente, em ponta obtusa, levemente emarginada. Clípeo trianguliforme, mais largo do que longo, com a margem apical sinuada, marginada, e os cantos externos arredondados.

P r o n o t o levemente compresso e foliáceo, fina e serradamente puncturado, excassamente pubescente; pilosidade fina, curta e fulvescente. O pronoto, visto de lado, apresenta-se com a linha de contorno superior direita, ligeiramente inclinada na região anterior, em seguida convexa e em declive mais ou menos direito para a região posterior; margem lateral direita, ligeiramente arqueada na extremidade apical do processo posterior. Linha mediana bem desenvolvida, saliente e cortante.

Processo ântero-lateral do pronoto muito desenvolvido, arqueado, envolvendo os olhos inferiormente, formando ângulo na secção anterior, elevado na extremidade posterior e tocando na junção do trocanter da coxa anterior; sôbre o pronoto, ao longo da carena mediana, notam-se quatro manchas branco-amareladas, uma anterior ligeiramente apagada, duas dorsais e uma posterior, nítidas. A última mancha dorsal e as posteriores, unem-se, às vezes, na margem post-lateral do processo posterior do pronoto.

Processo pronotal posterior direito, afilado para a extremidade apical, terminando em ponta aguda, direita, não excedendo a extremidade posterior dos tegmina.

T e g m i n a castanho-claros, opacos, na região basal levemente puncturados e ligeiramente translúcidos; duas células discoidais e cinco células apicais. Ha exemplares com três células discoidais.

A s a s enfumadas, com nervuras escuras; quatro células apicais.

P e r n a s amareladas; tíbias do primeiro e segundo pares, foliáceas, glabras na face externa; na face interna providas de pilosidade fraca, fina e fulvescente; tíbias do terceiro par não foliáceas, na face interna com densa pilosidade fulvescente, as margens laterais providas de uma fileira de espinhos curtos, recumbentes e de coloração castanho-clara; tarsos flavescentes.

Partes inferiores do torax castanho-amareladas.

Pleuras e abdomen castanho-escuros.

O ♂ assemelha-se à ♀.

Comprimento total, da margem anterior do pronoto à extremidade dos tegmina, 6,5 mms.; comprimento do pronoto, 5 mms.; largura do pronoto, entre os ângulos humerais, 2 mms.; comprimento dos tegmina, 4 mms.

C ó t i p o s : (2 ♀ e 1 ♂) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligidos por E. HAMBLETON e H. F. G. SAUER, 10-X-1938.

Erechtia trimaculata, n. sp.

Fig. 4

♂ — Castanho-escura, com três manchas branco-amareladas sôbre o pronoto; pubescente, fina e cerradamente puncturada; pubescência fina serícea, escassa e

fulvescente. Pronoto compresso, ao longo da linha mediana elevada em carena foliácea, percorrente e cortante. Lados do pronoto providos de uma carena fina, longitudinal, estendendo-se do alto do metopídeo à secção lateral mediana do processo pronotal posterior.

C a b e ç a retangular, convexa no centro, grossa e dispersamente puncturada, cada punctura provida de um pêlo fino, curto, seríceo e fulvescente. Margem basal inteira, direita na região central, curvada nos lados, antes de atingir os cantos internos orbiculares. Olhos pretos, circundados na base por uma lista estreita, castanho-clara. Ocelos perfeitamente circulares, amarelo-claros, citrinos, com brilho de ambar, equidistantes entre si e das margens laterais da genas, mais afastados da margem basal da cabeça. Região vertical depressa, notando-se, em cada lado, sôbre os ocelos, uma elevação convexa, com o formato de um lobulo fraco, trazendo, no lado interno, uma pequena depressão caliginosa, longitudinal, oviforme, glabra e opaca. Linha mediana formando fraca carena sôbre a região frontal. Expansões genais com as margens laterais externas, junto à cavidade orbicular, direitas, as extremidades apicais em ângulo arredondado. Clípeo trianguliforme, provido de puncturações grossas e dispersas, na região central ligeiramente voltada para cima e levemente marginada. Na base do clípeo observa-se, em cada lado, uma pequena área caliginosa, oval, longitudinal, glabra e luzidia.

P r o n o t o castanho-escuro fundamental, com três grandes manchas amarelo-claras, uma na região anterior, sôbre o metopídeo, outra na região central e a terceira, menor, localizada no terço posterior do processo pronotal posterior.

Tôda a superfície do pronoto tem puncturação grossa e cerrada; cada punctura provida de um pêlo curto, seríceo e fulvescente. Linha mediana do pronoto transformada em carena alta, percorrente, compressa, foliácea e cortante. Visto de perfil, pela linha do contorno superior, o pronoto apresenta-se, na secção anterior, em arco arredondado e projetado sôbre a cabeça, formando na parte inferior um pequeno lobulo; na região dorsal, leve convexidade, que se torna gradativamente atenuada para a região apical. Sôbre o pronoto há, em cada lado, uma carena linear, direita, localizada em sentido longitudinal oblíquo, acima dos ângulos humerais, entre a base do metopídeo e a secção medio-lateral do pronoto, sem alcançar a margem lateral.

Processo pronotal posterior afilado para a extremidade posterior, na região apical terminado em ponta aguda, levemente marginado no terço posterior. Ângulos humerais ligeiramente salientes, arredondados. Metopídeo tão largo quanto alto, fortemente convexo. Margens antero-laterais do pronoto, entre os olhos e os ângulos humerais, direitas, ligeiramente salientes. Impressões post-oculares caliginosas, assinaladas por uma depressão pouco profunda, glabra, em forma de Y.

Processo latero-anterior do pronoto ligeiramente arqueado, circundando os olhos, com o canto post-inferior em ângulo, e a margem inferior levemente marginada.

Partes inferiores do corpo castanho-escuras.

T e g m i n a castanho-escuros nas regiões basal e costal, pardo-claros nas regiões apical e anal. As regiões basal e costal são quitinisadas, grossas e densamente puncturadas; células basal e nervuras providas de pilosidade grossa, recumbente e flavascente. Duas células discoidais e cinco células apicais.

P e r n a s castanho-escuras, com as tíbias do primeiro e segundo pares dilatadas, providas de pilosidade fina e flavascente; tíbias do terceiro par com espinhos fortes, serrilhados e recumbentes.

Abdomen castanho-escuro.

Comprimento total, da extremidade anterior do pronoto à extremidade posterior dos tegmina, 5 mms.; comprimento do pronoto, 4 mms.; largura total do pronoto, entre os ângulos humerais, 2 mms.

Tipo (1 ♂) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligido por E. Hambleton e H. F. G. Sauer, 10-X-1938.

Esta espécie aproxima-se de *Erechtia binotata* (Funk.) (Funkhouser, *The Canadian Entomologist*, Vol. XLVI, p. 359, pl. 24, fig. 34, 1914). Difere, porém, desta, principalmente, por apresentar a linha mediana do pronoto transformada em carena alta, ligeiramente foliácea; pela presença de três manchas claras sôbre o dorso do pronoto e por ter duas células discoidais.

Subfamilia *Smiliinae*

Polyrhyssa cultrata maculata, nov. subsp.

Figs. 5 e 6

♀ — Verde-olivácea fundamental, glabra, fina e densamente puncturada; sôbre o pronoto uma série de estrias finas, longitudinais, salientes, amarelo-claras; dorso do pronoto em curvatura pouco pronunciada; linha mediana em carena deprimida, direita e cortante.

Cabeça mais larga do que longa, verde-olivácea, ligeiramente amarelada, glabra, fina e densamente puncturada e levemente rugulosa. Região basal arqueada, bissinuada. Expansões genais com as margens laterais, junto aos olhos, direitas, em seguida quebradas, ligeiramente arqueadas para dentro, marginadas e terminadas na extremidade apical em ângulo agudo. Ocelos amarelos, luzidios, equidistantes entre si, dos olhos e da margem basal da cabeça e mais afastados das margens laterais das genas. Olhos oblongos, transversais, ligeiramente atenuados para a parte externa, pardacentos e manchados de negro. Clípeo mais largo do que longo, aplanado na parte superior, na extremidade apical recurvado para dentro, provido de pêlos eretos e fulvescentes. Sutura mediana levemente sulcada sôbre a fronte.

Pronoto naviforme, ligeiramente arqueado no dorso, glabro, fina e densamente puncturado, de coloração verde-oliva fundamental. Ao longo da linha mediana nota-se uma estria estreita, castanho-escura, seguida de uma faixa lateral mais ampla, verde-amarelada, mais alargada sôbre o processo pronotal anterior. Sôbre o pronoto, em sentido longitudinal, uma série de frisos salientes, lineares, de coloração amarelo-clara; no centro, quasi junto à margem lateral, uma mancha preta.

Processo pronotal anterior dirigido para frente, ligeiramente compresso e voltado para cima, com a extremidade apical ligeiramente espatulada e arredondada.

Processo pronotal posterior tectiforme, gradativamente atenuado para a parte posterior, ultrapassando a extremidade dos tegmina e com a extremidade apical em ângulo agudo. Margens laterais direitas, marginadas. Estrias do pro-

cesso pronotal posterior, em número variável de cinco a sete. Linha mediana direita, percorrente, no dorso do pronoto elevada em carena desenvolvida e cortante. Metopídeo estreito, convexo, inclinado para frente, provido, de cada lado, de um sulco transversal, caliginoso, cujas extremidades externas quasi tocam à margem anterior do pronoto, junto aos olhos. Margens laterais do pronoto, entre os olhos e os ângulos humerais, em carena direita, curta e cortante. Ângulos humerais agudos.

Partes inferiores do corpo e pernas, pardacentas.

Tíbias alargadas, planas no lado externo; os flancos providos de pequenos tubérculos espiniformes, esparsos e recumbentes.

Tegmina pardo-escuros, opacos, com nervura grossa e provida de puncturação fina e irregularmente disposta; região marginal costal quitinizada e densamente puncturada; margens anal e apical translúcidas. Quatro células apicais e duas células discodais.

Asas hialinas, com nervuras pardo-escuras; quatro células apicais.

O ♂ assemelha-se à ♀.

Comprimento total, do ápice do apêndice pronotal anterior à extremidade dos tegmina, 7 mms.; largura do pronoto entre os ângulos humerais, 2 mms.; comprimento dos tegmina, 5 mms.

Cótipos (2 ♀ e 1 ♂) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligidos por E. HAMBLETON e H. F. G. SAUER, 10-X-1938.

Difere de *P. cultrata* FABRICIUS (*Syst. Rhyng.* IV, p. 14, 1803) pela presença de duas manchas pretas, muito nitidas, nos lados do pronoto.

Maturna multilineata, n. sp.

Figs. 7 e 8

♀ — Verde-olivácea, ligeiramente pardacenta, com estrias longitudinais amareladas; pronoto levemente depresso sôbre os ângulos humerais, alto na região mediana e compresso para a parte posterior.

Cabeça transversa, mais larga do que longa, glabra, grossa, dispersamente puncturada, ligeiramente rugulosa na secção latero-inferior das genas. Região basal levemente bissinuada. Olhos pardecentos, mais longos do que largos, ligeiramente dirigidos para a parte posterior da cabeça. Ocelos muito diminutos, amarelos, com brilho de ambar, equidistantes entre si, dos olhos e das margens basal e lateral da cabeça. Fronte levemente depressa e provida de um pequeno sulco longitudinal. Expansões genais mais longas do que largas, atenuadas para a extremidade apical, com as margens laterais direitas, margens inferiores sinuadas, voltadas para cima e levemente enrugadas. Clípeo mais longo do que largo, convexo na região central, depresso nas regiões basal e apical, com o ápice arredondado, formando uma carena alargada.

Pronoto projetado sôbre a cabeça, fina e cerradamente puncturado, glabro e opaco. Visto de perfil, o pronoto apresenta-se com a linha de contorno abaulada superiormente, ligeiramente depressa sôbre os ângulos humerais, mais elevada na região mediana e em declive suave para a extremidade posterior. Visto

de cima, ligeiramente constrito nas regiões anterior e posterior aos ângulos humerais; elevada na secção mediana e em declive fraco para o ápice. Sôbre os flancos do pronoto notam-se, em cada lado, a partir do metopídeo, seis carenas lineares, salientes, longitudinais, paralelas, direitas e bifurcadas sôbre os ângulos humerais. As quatro primeiras carenas terminam na linha mediana sôbre o processo pronotal posterior, e as duas últimas finalizam na extremidade posterior do mesmo processo. Carena mediana bem desenvolvida, saliente, cortante sôbre o terço posterior do pronoto.

Processo pronotal posterior tectiforme, compresso na metade posterior, na região apical terminando em ângulo agudo, ultrapassando os tegmina. Margens laterais direitas, levemente curvadas na região mediana.

Metopídeo mais largo do que alto, fortemente inclinado para a região posterior do pronoto. Margem anterior do pronoto avançada sôbre a cabeça, curvada e levemente marginada. Ângulos humerais arredondados, não proeminentes. Margem látero-anterior do pronoto, entre os olhos e os ângulos humerais, formando uma carena direita, levemente marginada, seguida, no lado interno, de uma depressão estreita, longitudinal. Impressões caliginosas post-oculares profundas, opacas e arqueadas para a margem anterior do pronoto.

Partes inferiores do tórax castanho-escuras. Abdomen curto, não atingindo a secção mediana do processo pronotal posterior.

Pernas castanho-escuras, com tíbias aneladas de amarelo-escuro. Tarsos castanho-escuros.

Tegmina com dois terços de sua largura cobertos pelo pronoto; região basal e costal coriáceas, pardo-acastanhadas; região apical e anal, hialinas; margem costal levemente curvada; quatro células apicais e uma célula discoidal.

Asas hialinas, com nervuras escuras e com três células apicais. Comprimento total, do ápice do apêndice pronotal anterior à extremidade dos tegmina, 6 mms.; comprimento dos tegmina, 3½ mms.; largura entre os ângulos humerais, 2 mms.

Cótipos (2 ♀♀) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligidos por E. HAMBLETON e H. F. G. SAUER, 10-X-1938.

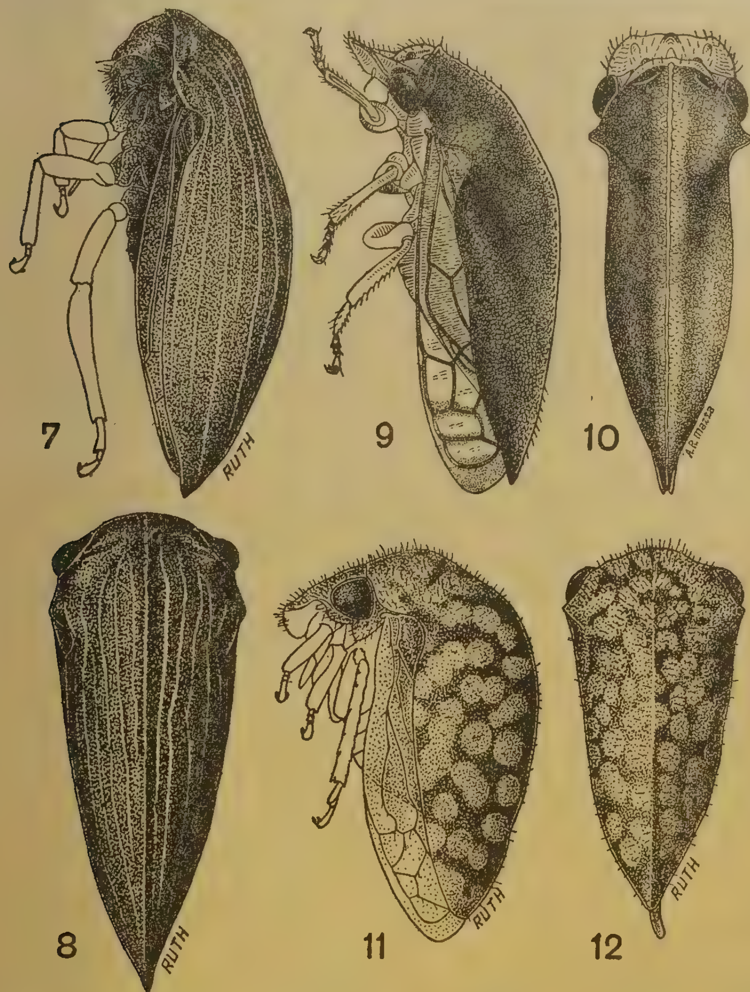
Esta espécie é muito chegada a *M. parvula* FABRICIUS (*Syst. Rhyng.* p. 32, 1803) e de *M. hoydi* FUNKHOUSER, (*Jour. N.Y. Ent. Soc.* XXII, p. 280, pl. 11, figs. 1-2, 1914). Difere da primeira pela declividade do pronoto, não tão abrupta sôbre o metopídeo, e pela maior altura da região médio-dorsal do pronoto. Difere da segunda, principalmente, pela curvatura mais pronunciada no dorso do pronoto, bem como pelas estrias lineiformes, que se apresentam em maior número.

Tynella flavodorsata, n. sp.

Figs. 9 e 10

♀ — Castanho-escura uniforme, sôbre o pronoto, ao longo da linha mediana, uma estria pardo-amarelada; margens laterais do pronoto entre os ângulos humerais e os olhos, amarelas; cabeça, partes inferiores do corpo e pernas, castanho-escuras.

C a b e ç a horizontal, quasi tão larga quanto longa, côncava, com ligeira convexidade na região frontal, lisa, luzidia e provida de fraca pilosidade serícea, fulvecente, alongada e dispersa. Região basal com margem ligeiramente ondulada,



Figs. 7 e 8 — *Maturna multilineata*, n. sp. (aumento 16×). Figs. 9 e 10 — *Tynella flavodorsata*, n. sp. (aum. 12×). Figs. 11 e 12 — *Amastris guttata*, n. sp. (aum. 14×).

provida, em cada lado, na região super-ocular, de fraca entumescência. Linha mediana bem pronunciada e levemente sulcada na metade superior. Ocelos proeminentes, perfeitamente circulares, amarelo-claros, translúcidos, luzidios, afastados

entre si e equidistantes das margens laterais e superiores da cabeça. Expansões genais com a margem externa bissinuada, levemente reentrante junto aos olhos, na região post-ocular, levantada, convexa, cortante, região apical aguda. Vistas de cima, as expansões genais apresentam, entre os olhos e os ocelos, duas depressões longitudinais, estreitas, profundas e convergentes entre os cantos superlaterais da cabeça e a extremidade distal das genas, formando um V. Clípeo alongado, convexo, mais largo na base, glabro, luzidio, sua região basal, marginada e trazendo uma depressão estreita e transversal; na extremidade apical, provido de um feixe de pêlos castanho-escuros. Olhos grandes, proeminentes, oblongos, com manchas pardo-escuras.

Pronoto convexo, castanho-escuro, grossa e cerradamente puncturado, provido de pêlos finos, fulvescentes, curtos, erectos e dispersos; de perfil com a linha de contorno superior em fraco declive e ligeiramente curvada; na região dorsal anterior a linha apresenta-se quasi reta e no têrço posterior em leve declive para o ápice. Margens laterais, no têrço anterior, marginadas, reentrantes junto aos cantos humerais e direitas para a extremidade apical, formando com a carena mediana, uma ponta aguda. Visto de cima, o pronoto apresenta-se hemielíptico, alongado, levemente comprimido lateralmente na região central, com as linhas de contorno laterais quasi paralelas na secção mediana e convergindo, gradativamente, para a parte apical.

Metopídeo mais largo do que longo, ligeiramente convexo.

Tegmina hialinos, somente com uma pequena área basal coriacea, densamente puncturado e de coloração pardo-amarelada; nervuras espessas, pardo-escuras, as do interior do córeo fuliginosas e mais grossas; radial e nervuras que limitam a 1.ª e 2.ª células apicais, marcadas por uma série de puncturações finas, cada ponto provido de um pequeno pêlo; abrangendo as nervuras transversais, entre a radial e a ulnar, uma pequena mancha enfuscada; entre a primeira e segunda apicais e entre esta última e a terceira apical, uma mancha transversal enfuscada, a qual é mais alargada entre as duas primeiras células; limbo com a extremidade apical enfuscada; duas células discoidais e cinco células apicais.

Asas luzidias, com quatro células apicais.

Partes inferiores do corpo de coloração castanho-clara, uniforme. Primeiro artículo dos tarsos posteriores provido, no lado interno, de numerosos pequenos dentes espiculiformes, recumbentes, castanho-escuros.

Comprimento total, da cabeça à extremidade posterior do corpo, 6 mms.; comprimento do pronoto, 4½ mms.; largura entre os cantos humerais, 2½ mms.

Cótipos (2 ♀♀) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligidos por E. HAMBLETON e H. F. G. SAUER, 10-X-1938.

Esta espécie é afim de *Tynella longula* BURMEISTER (*Handbuch der Entomologie*, II, p. 134, 1835), e de *Tynella nigra* FUNKHOUSER (*Journal New York Ent. Soc.*, Vol. XLVIII, pag. 257, 1940). Difere de ambas por apresentar os ângulos humerais e a margem látero-anterior do pronoto, entre os humerais e os olhos, percorrida por uma

carena reta, amarelo-clara. Ao longo da linha mediana, sôbre o pronoto, nota-se, igualmente, uma estria larga, pardo-clara. Nos tegmina, quatro manchas escuras.

Amastris guttata, n. sp.

Figs. 11 e 12

♀ — Auranceo-escura, com manchas ceruleo-claras; densamente puncturadas, luzidia, escassamente pubescente; pronoto ligeiramente compresso na metade posterior; de perfil, em arco arredondado, mais alto na região mediana, levemente depresso acima do metopídeo; metopídeo levemente inclinado; partes inferiores do corpo e pernas ferrugineo-claras.

Cabeça mais larga do que longa, luzidia, grossa e dispersamente puncturada, provida de pilosidade grossa e dispersa; margem basal levemente arqueada, bissinuada e fracamente marginada. Olhos grandes, proeminentes, globuliformes, castanho-claros. Ocelos diminutos, arredondados, vermelho-claros, com brilho de ambar, equidistantes entre si e das margens basal e laterais. Expansões genais tão largas quanto longas, com a margem externa direita fracamente sinuada, a extremidade apical terminada em ângulo agudo. Fronte com leve depressão no centro, junto à margem basal. Linha mediana em carena saliente, no têrço inferior interrompida por um pequeno sulco longitudinal. Clípeo trianguliforme, tão largo quanto longo, ligeiramente convexo no centro; contorno marginal interno arredondado; cantos antero-laterais obtusos; extremidade apical recurvada para baixo e provida de um feixe de pêlos grossos, dispersos, erectos e castanho-claros.

Pronoto de coloração alaranjado-escura, luzidio, com manchas irregulares azul-claras; tôda a superficie do pronoto é marcada de puncturação grossa e provida de pêlos esparsos, erectos e arruivados. De perfil, apresenta-se o pronoto com a linha de contorno superior em arco arredondado, mais alta na secção mediana, levemente depressa acima do metopídeo, em leve declineo para a parte posterior; visto de cima, apresenta-se o pronoto cuneiforme, compresso superior e posteriormente, a partir dos ângulos humerais. Margens laterais levemente arqueadas.

Metopídeo mais largo do que alto, em declive vertical sôbre a cabeça, com leve depressão transversal junto à margem anterior entre os olhos. Carena mediana forte, percorrente, mais pronunciada sôbre os dois têrços posteriores do pronoto. Cantos humerais em ângulo obtuso.

Processo pronotal posterior terminado em ponta obtusa, não alcançando as extremidades dos tegmina.

Tegmina hialinos, com nervuras grossas, percorrentes e marcadas por puncturações esparsas, cada puncturação provida de um pêlo erecto; cinco células apicais e três discoidais. Limbo alargado na margem apical.

Asas com quatro células apicais.

Partes inferiores do corpo e pernas ferrugineo-claras. Femures e tíbias providas de pilosidade grossa, dispersa, erecta e ferrugineo-clara. Tíbias posteriores providas de espinhos dentiformes, recumbente, variáveis de tamanho, pretos e luzidios.

Comprimento total, da frente do pronoto à extremidade dos tegmina, 4 mms.; altura do pronoto 3 mms.; largura entre os humerais 2½ mms.; altura do pronoto 1½ mms.

Tipo (1 ♀) na coleção do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Habitat: Belém, Estado do Pará, Brasil. Coligido por E. HAMBLETON e H. F. G. SAUER, 10-8-1938.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE NEOTROPICAL MEMBRACIDAE (IV)

Abstract

In this paper six new species and one new sub-species are described. One of the species is from Santos, São Paulo and the rest from Belem, Pará.

———o———

DESCRIÇÃO DE UM NOVO GÊNERO E NOVA ESPÉCIE DE COCCÍDEO PRODUTOR DE GALHAS (HOMOPTERA - COCCOIDEA)

POR

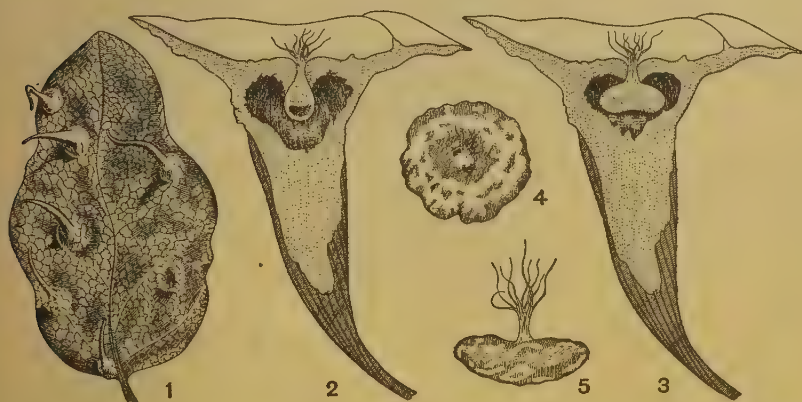
H. S. Lepage

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 17 figuras no texto

Em fins de 1939 encontrei na localidade denominada Prainha, próximo à ponte pensil de S. Vicente, uma planta silvestre que apresentava numerosas galhas nas folhas. Essas galhas, que mais tarde tambem foram encontradas em Guarujá, são produzidas por um coccídeo muito interessante, pertencente a um novo gênero — *Aculeococcus* — do qual passarei a dar a diagnose.

O novo gênero pertence à familia *Kermidae* e aproxima-se de *Calycicoccus* BRAIN (1).



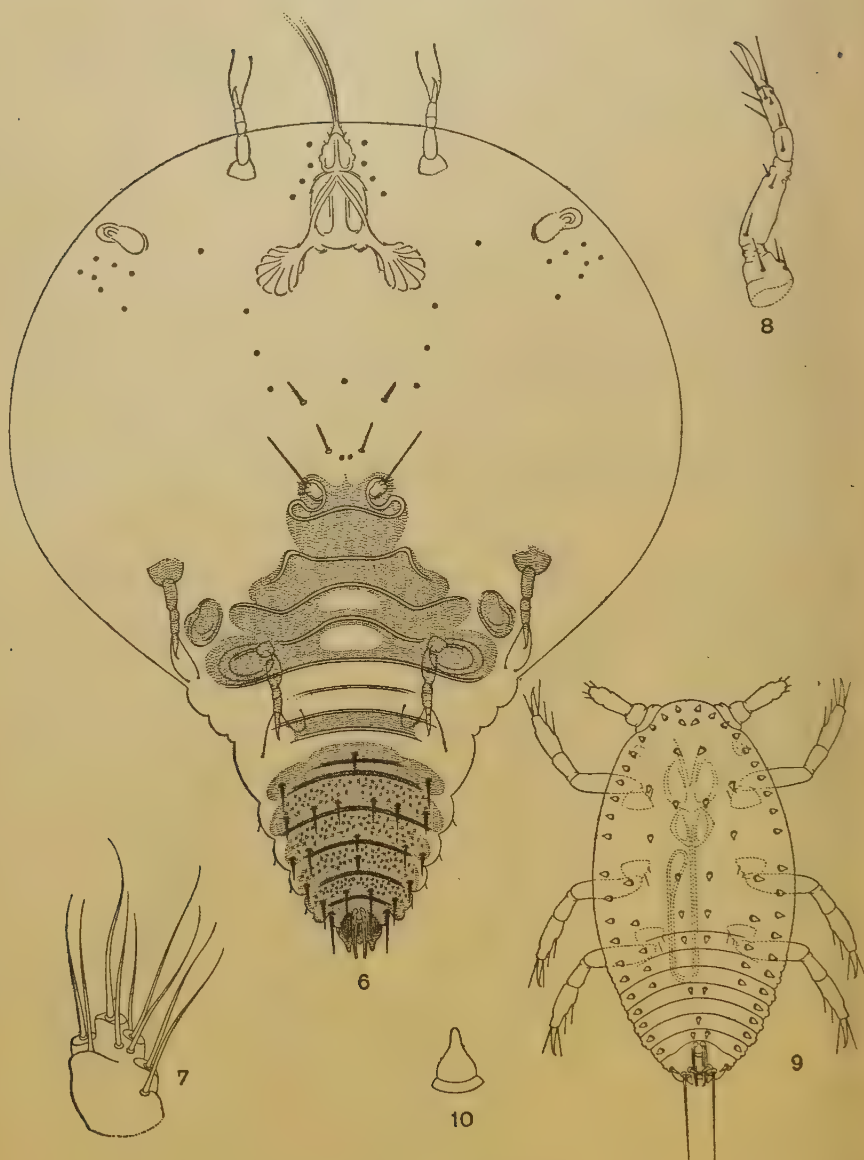
Aculeococcus morrisoni, nov. gen. nov. sp. — Fig. 1 — Folha apresentando galhas. Figs. 2 e 3 — Cortes de galha — aumentados. Figs. 4 e 5 — Fêmea adulta, de frente e de perfil (Ribeiro Silva del.)

Aculeococcus, n. g.

Figs. 1 - 13

Fêmea adulta encerrada em galhas nas folhas da planta hospedeira. Galhas de forma cônica com abertura no centro da base. Fêmea adulta apresentando distorsão do corpo e com a parte abdominal esclerosada. Fêmea apresentando

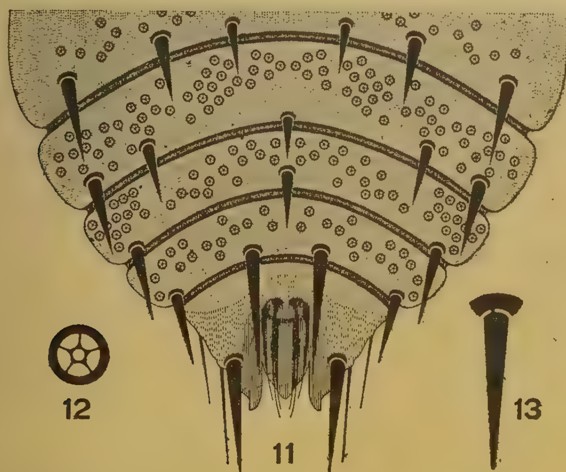
(1) — L. Lindinger, em seu trabalho "Verzeichnis der Schildlaus-Gattungen" publicado no "Entomologisches Jahrbuch — 1937" a pagina 181, diz que a formação gramatical do nome *Calycicoccus* está errada, devendo ser corrigida para *Calycococcus*.



Aculeococcus morrisoni, nov. gen. nov. sp. — Fig. 6 — Fêmea adulta — muito aumentada. Fig. 7 — Antena da fêmea adulta — aumentada. Fig. 8 — Pata anterior — aumentada. Fig. 9 — Larva — muito aumentada. Fig. 10 — Espinhos cônicos da larva (Ribeiro Silva del.)

uma constrição entre o tórax e o abdomen de modo a formar uma espécie de cauda. Antenas da fêmea adulta, rudimentares. Patas fracamente desenvolvidas. Coxas do 3.º par de patas fortemente dilatadas. Abdomen de forma cônica, apresentando fortes espinhos cônicos. Anel anal com 6 cerdas anais e póros. Lobulos abdominais presentes.

O gênero *Aculeococcus* aproxima-se do gênero *Calycicoccus* criado por Brain, em 1918, na África do Sul, para a sua espécie *Calycicoccus merwei* Brain, (*The Coccidae of South Africa II — Boletin of Entomological Research*, Vol. IX pg. 111, 1918/1919), figs. 14-17, do qual facilmente se distingue pelos seguintes caracteres: galhas com abertura na base e não no ápice como em *Calycicoccus;* constrição no corpo da fêmea adulta, não existente em *Calycicoccus;* área esclerosada mais definida em *Aculeococcus;* coxas do 3.º par de patas normais



Aculeococcus morrisoni, **nov. gen. nov. sp. — Fig. 11 — Extremidade abdominal da fêmea adulta — aumentada. Fig. 12 — Póro quinquelocular abdominal — muito aumentado. Fig. 13 — Espinho abdominal — aumentado. (Ribeiro Silva del.)**

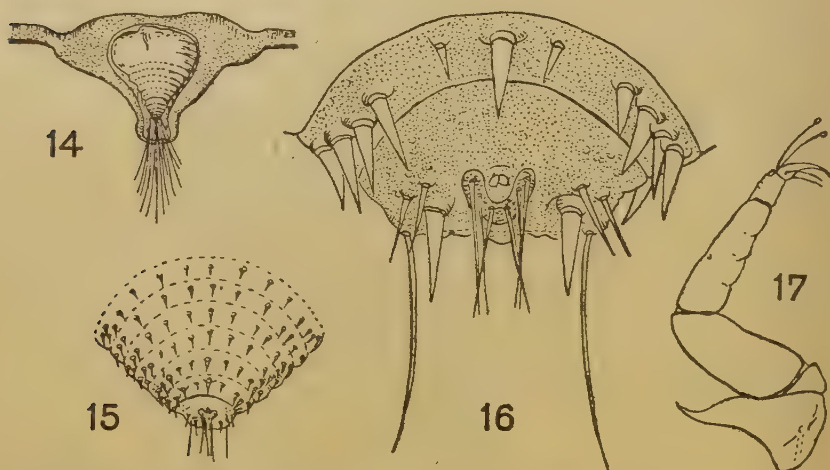
em *Calycicoccus* e fortemente dilatadas em *Aculeococcus;* póros quinqueloculares presentes na face ventral em *Calycicoccus,* enquanto, em *Aculeococcus,* ocorrem nas duas faces; lóbulos apicais presentes em *Aculeococcus,* e não em Calycicoccus; anel anal na extremidade posterior do corpo em *Calycicoccus,* enquanto, em *Aculeococcus,* é mais anterior; antenas rudimentares em *Aculeococcus* e de 4 segmentos em

Calycicoccus. Para seu gênero *Calycicoccus* criou BRAIN a nova subfamilia *Calycicoccinae*.

Os demais caracteres serão descritos na espécie tipo, o *Aculeococcus Morrisoni*, n. sp.

Aculeococcus Morrisoni, n. sp.

Fêmea adulta encerrada em galhas de forma cônica encontradas na face superior das folhas da planta hospedeira. Encontramos dois típos de galhas, ambas na face superior das folhas. Umas, em grande maioria, maiores, cônicas, em forma de espinho, de coloração ligeiramente mais clara que a folha, medindo 2 milímetros de diâmetro na base por 17 milímetros de altura, em média. Outras, em menor número porém de muito menores dimensões, são tambem cônicas e têm, em média, 1 milímetro de diâmetro por 5 de altura, mais parecendo um pêlo grosso.



Calycicoccus merwei BRAIN (segundo BRAIN — *Bul. Ent. Res.* IX — pg. 111 — 1918-1919). Fig. 14 — Fêmea adulta. Fig. 15 — Extremidade abdominal da fêmea adulta — aumentada. Fig. 16 — Extremidade abdominal da fêmea adulta — muito aumentada. Fig. 17 — Perna do 3.º par.

As galhas maiores são uniformemente cônicas, às vezes com o ápice recurvado, e apresentando, algumas vezes, uma constrição próxima da base.

Na face inferior das folhas notamos depressões que correspondem às galhas existentes na outra página. No centro dessas depressões encontramos, nas galhas maiores, orifícios centrais, por onde produzem filamentos brancos de cêra. Nas galhas pequenas não encontramos orifícios.

No interior, as fêmeas adultas, colocadas com a extremidade abdominal voltada para orifício da galha. Nas galhas pequenas nada encontrámos, parecendo que contiveram machos.

A fêmea adulta mede 2 a 3,3 milímetros de comprimento por 1,2 a 2,8 de largura; é de côr avermelhada, e tem o corpo em forma de pião, quando nova;

depois de completamente desenvolvida, toma o aspecto de um figo sêco; fervida na potassa cáustica a 10%, torna-se hialina, exceto nas partes bucais, pernas, antenas e extremidade caudal.

Antenas rudimentares constituidas por um tubérculo com 6 a 10 pêlos. Partes bucais fortes e bem desenvolvidas. Pernas fracamente desenvolvidas, com exceção do 3.º par, que apresenta as coxas fortemente dilatadas. Estigmas torácicos presentes, grandemente distanciados uns dos outros e apresentando em volta dos anteriores vários orifícios glandulares. Aparelho bucal fortemente desenvolvido.

Larva de côr amarelada, elítica, provida de antenas bem desenvolvidas, de 3 segmentos. Pernas normais. Aparelho bucal desenvolvido. Marginando o corpo da larva encontramos uma fileira de fortes espinhos cônicos, de extremidade arredondada; na face dorsal do corpo, notamos idênticos espinhos, em número reduzido e espalhados em 4 carreiras longitudinais. Na extremidade abdominal encontramos dois fortes espinhos, longos, cujo comprimento chega a atingir 1/4 do corpo da larva. Anel anal com seis cerdas.

Encontrado nas folhas de planta silvestre no local denominado Prainha, no Município de S. Vicente e em Guarujá, Município de Santos, em 8 de Agosto de 1939, pelo autor, em arbusto que vive junto da praia.

Material típico incorporado às coleções do Instituto Biológico de São Paulo, Departamento de Zoologia de S. Paulo e Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Como prova de reconhecimento e de consideração, é a presente espécie dedicada ao professor HAROLD MORRISON, *Senior Entomologist do Bureau of Entomology and Plant Quarentine* do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, de quem o autor tem recebido muitos e preciosos ensinamentos.

DESCRIPTION OF A NEW GENUS AND NEW SPECIES OF GALL-MAKING COCCIDAE (HOMOPTERA - COCCOIDEA)

Abstract

This paper contains the description of a new genus and new species from Santos, S. Paulo-Brazil.

———o———

Vol. 12 — Art. 12 Novembro de 1941

DOENÇA DE PINTOS CAUSADA PELO BACILO PIOCIÂNICO

POR

J. Reis

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 33-40

Embora frequentemente isolado de diversos processos patológicos, raras vezes pode o bacilo piociânico ser apresentado como seu agente causal, figurando antes como germe de associação ou invasão secundária. Este fato conduz geralmente o bacteriologista a não atribuir maior importância ao achado do bacilo piociânico nos materiais que estuda, o que é um erro, pois tal atitude só se justifica após exame muito rigoroso que permita, em cada caso, excluir a participação ativa desse germe no processo.

O presente trabalho trata de casos espontâneos de uma doença produzida pelo bacilo piociânico, a qual apresenta diversos pontos de contato com a descrita em 1930 por ESSEX e colaboradores. Estes autores descrevem, em pintos de cinco a nove semanas, epizootia com mortalidade de 75% e caracterizada pelos seguintes sintomas: alterações respiratórias, inatividade, depressão, olhos fechados, palidez e, ulteriormente, exsudato aquoso e massas caseosas nos olhos.

A autópsia revelava hiperemia dos orgãos internos, às vezes enterite e necrose intestinal, leucopenia e anemia. O germe isolado desses casos (*Pseudomonas aeruginosa*) era patogênico para pintos por via venosa, mas não por via oral.

A DOENÇA ESPONTÂNEA

Em setembro de 1940 recebemos para estudo (caso 6980 da Secção de Ornitopatologia), 4 pintos de raça *Rhode Island Red,* de um lote de 20 que se apresentavam todos doentes.

A doença apareceu quando os pintos tinham cerca de 20 dias; evoluiu de modo mais ou menos lento, manifestando-se por prostração e definhamento progressivo; os animais, nos estados finais da doença, não se mantinham de pé mas conservavam-se sentados sobre os tarsos. Pouco antes da morte aparecia dispnéia e, em alguns casos edema da cabeça, particularmente acentuado em torno dos olhos.

Do lote atacado, só um pinto se salvou, tendo a doença durado, em todo o lote, cerca de 15 dias.

A dispnéia e o edema poderiam fazer suspeitar de forma grave de coriza, suspeita logo afastada pelas pesquisas bacteriológicas, em que não se encontraram os agentes da coriza infectuosa (exame de esfregaços do líquido de edema e do exsudato ocular, tentativas de isolamento do *Hemophilus gallinarum*, tentativas de reprodução experimental da doença por instilação nasal e ocular do exsudato colhido nos olhos, nariz e traquéia).

A postura dos animais, sentados sobre os tarsos e com os dedos encolhidos, poderia fazer pensar no raquitismo, hipótese logo afastada pelo "line-test" de McCOLLUM e cols., que revelou ossificação normal nas tíbias examinadas.

Foram igualmente negativos os exames de fezes para eimerias e ovos de helmintos.

Dos 4 pintos recebidos, três foram sacrificados *in-extremis* e o último mantido em observação por alguns dias. Dos três primeiros, um apresentava edema evidente da cabeça, alem da prostração observada em todos. O que se manteve em observação, em gaiola individual, começou ao fim de uns três dias a manifestar edema, sendo então sangrado para hemocultura, e logo depois sacrificado.

O exame necroscópico dos quatro pintos acima revelou o seguinte:

Pinto A. — Fígado aumentado e duro, com pequeninas manchas claras de necrose. Vesícula biliar muito dilatada. Baço aumentado, com manchas semelhantes às do fígado. Coágulo soro-fibrinoso na traquéia. Edema gelatinoso nos tecidos subcutâneos da cabeça, catarro abundante na cavidade nasal e seios anexos.

Isola-se o bacilo piociânico do fígado, da traquéia e do exsudato dos seios e do nariz, assim como do líquido de edema.

Pinto B. — Nenhuma alteração apresenta digna de registo. Isola-se o germe do fígado.

Pinto C. — (Hemocultura positiva para bacilo piociânico). Nenhuma alteração revela o cadaver, alem do edema cefálico.

Pinto D. — Coágulo mucoso na traquéia. Enterite, estando o intestino cheio de conteudo sanguinolento. Germe isolado do fígado.

O esfregaço do líquido de edema mostrou nos dois animais em que esta condição ocorreu, abundantes germes gram-negativos. Os esfregaços dos orgãos, especialmente fígado, mostravam raros desses germes, isolados e fagocitados.

O GERME

Conforme já referimos, isolou-se o bacilo piociânico de todos os casos examinados, tanto dos orgãos de cadáveres recentes quanto do sangue de animal doente.

São os seguintes os caracteres do germe isolado:

Caldo Hottinger: — Turvação e formação de película delicada. Produção de pigmento verde-amarelado não soluvel em clorofórmio (fluoresceina) já evidente em 24 horas. O pigmento azul, soluvel em clorofórmio (piocianina), ocorre precocemente, a não ser em uma das amostras isoladas (pinto C, hemocultura); nesta amostra a piocianina só se evidencia com nitidez após seis dias.

Água de peptona: — O germe comporta-se como no caldo, mas a produção do pigmento azul é muito mais intensa.

Gelatina: — Em 24 horas começa a liquefação, a princípio crateriforme e depois estratiforme.

Leite: — Peptonizado; não se desenvolve o pigmento azul.

Fermentação de açúcares (água de peptona com indicador de ANDRADE; açucar na razão de 1% (*): — Dos açúcares experimentados (glicose, levulose, manose, adonita, sacarose, rafinose, arabinose, dulcita, sorbita, manita, trealose, dextrina, inosita, esculina, xilose, ramnose, amido, lactose, maltose e salicina) somente a glicose e a manose são fermentadas, esta mais lentamente do que aquela. A esculina perde a fluorescência característica. Quanto à produção de pigmento nesses meios, convem assinalar que o pigmento amarelo deixa de ocorrer tambem na xilose; uma das amostras (pinto C) produz fluorescência na ramnose, ao passo que as demais não a produzem.

Em placas de agar, as amostras formam colônias típicas, esparramadas e de cheiro característico. Vegetam em meio de Holt-Harris e Teague, formando colônias de cor rósea, regulares, que podem ser confundidas com as de certos representantes do grupo *coli.* O cheiro, porem, é sempre peculiar.

O poder patogênico da amostra isolada do pinto C (tardia produção de piocianina) é um pouco maior que o da amostra isolada dos outros casos; inoculada por via peritoneal (cult. de 24 hs.), ainda sem piocianina, aquela amostra mata camondongo (dose 0.1 cc.) e coelho, (dose 0.2 cc.), morrendo o camondongo em 2 dias e o coelho em 6; mas não mata cobaia.

A amostra isolada dos outros casos (piocianina precoce) não mata nenhum destes animais.

Ambas as amostras são patogênicas para pintos (veja reprodução experimental).

Em caso algum se conseguiu isolar o germe da bile, mesmo quando semeada em grande volume de caldo.

Do saco vitelino, ainda quando visivelmente alterado, tambem não foi isolado o germe.

Das fezes o germe foi isolado sempre que se teve o cuidado de fazer a semeadura por diluição em varias placas sucessivas. No caso

(*) Açúcares da fabrica Pfannstiehl.

contrário, isto é, quando se semeia uma só placa, em geral o piociânico não se desenvolve, dominado pelos germes do grupo *coli*.

REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL

O poder patogênico das amostras de bacilo piociânico para os animais de experiência é fraco e irregular, só se manifestando, geralmente, após inoculação parenteral. O poder patogênico de amostras aviárias está referido no livro de REIS e NÓBREGA.

Infecção *per os*. Ao contrário de ESSEX e cols., que apenas por via parenteral conseguiram infecção de pintos com a amostra por eles isolada, nós conseguimos reproduzir em pintos a doença que estudamos, por inoculação de amostras de b. piociânico por via oral. Para isso usamos seja triturado de orgãos de pintos com infecção espontânea, dos quais se isolava o germe, seja culturas puras do germe em caldo, depois de diversos transplantes sucessivos. A idade dos pintos, todos de raça *Leghorn branca*, era de um dia, num lote, e de 10 dias, noutro.

A. A suspensão de orgãos (fígado e baço) de pinto com infecção espontânea foi inoculada em dois pintos de 10 dias, por via oral, gota a gota, evitando-se toda lesão da mucosa bucal, sendo de 0.5 cc. a quantidade inoculada em cada pinto.

Um dos pintos começa a entristecer e definhar seis dias após a inoculação; seis dias após apresentava-se muito triste, sentado sobre os tarsos, morrendo nesse dia. O germe foi isolado em cultura pura do fígado.

O outro pinto começou a entristecer quatro dias após a inoculação e desenvolveu forma lenta de doença, sucumbindo ao fim de 33 dias. Antes de morrer apresentou edema da cabeça, como em alguns casos espontâneos. Isolou-se o germe do fígado e do rim.

B. As culturas utilizadas nas experiências de infecção experimental eram feitas em caldo Hottinger, tinham 24 horas de incubação a 37° e já haviam sofrido pelo menos 5 transplantes sucessivos. Usaram-se pintos de um dia, cada um dos quais recebia 0.5 cc., gota a gota, por via bucal, com as mesmas precauções das experiências anteriores.

Com a amostra A (produção precoce de piocianina) inocularam-se sete pintos, cinco dos quais morreram em 24 horas e dois em 96; num destes últimos desenvolveu-se edema da cabeça, com colamento das pálpebras. Isolou-se de todos a amóstra inoculada, tanto dos orgãos quanto das fezes.

Infecção por outras vias — Morreu em 8 dias um pinto de dez dias, inoculado por via muscular com triturado de fígado e baço de pinto com doença espontânea, isolando-se a amostra inoculada de todos os orgãos semeados.

Não provocou doença a instilação, no olho de três pintos, de suspensão espessa de exsudato traqueal e nasal de pintos com a doença espontânea.

ANATOMIA PATOLÓGICA

Na descrição da doença espontânea já fizemos referências às alterações macroscópicas observadas na necrópsia. Limitar-nos-emos agora à descrição das alterações macroscópicas observadas nos animais inoculados, e das microscópicas observadas tanto em casos espontâneos quanto em experimentais.

A. INFECÇÃO ESPONTÂNEA. Só um dos pintos com infecção espontânea pôde ser examinado microscópicamente: o que apresentava evidentes lesões macroscópicas.

Fígado. Impressiona a esclerose do orgão, acentuada ao nivel dos espaços-porta e daí expandindo-se. Em torno desses espaços nota-se neoformação de pseudocanalículos biliares. Os canalículos biliares dos espaços-porta são sede de processo inflamatório purulento, vendo-se-lhes o epitélio degenerado e desagregado e, no interior, coleções purulentas que formam às vezes verdadeiros trombos obliterantes. Esses canais mostram-se grandemente dilatados e cercados de manguitos de células mesenquimatosas, de protoplasma irregular e núcleo acentuadamente basófilo.

Espalhados pelo parênquima, e em geral nas vizinhanças de espaços-porta, veem-se focos de necrose de coagulação que podem ser extensos, em cujo centro às vezes se percebem acúmulos de leucócitos pseudoeosinófilos.

Outras alterações são constituidas por formações granulomatosas com grande massa caseosa central, acidófila, na qual se distinguem grandes maciços bacterianos, cercada por coroa de células gigantes e, por fora desta, anel de células histiocíticas e tecido conjuntivo frouxo. Tambem ocorrem nódulos inflamatórios esparsos formados apenas por acúmulos de células de caracter histiocítico. Nas lesões desse tipo, ou na sua vizinhança, não se encontram elementos parasitários do tipo dos encontrados na enterohepatite.

Nas células do fígado, indícios de degeneração gordurosa.

Baço. Chama a atenção a quase ausencia de folículos linfóides típicos. Espalhados pelo corpo veem-se dois tipos de estruturas patológicas: 1) Zonas claras, formadas de células reticulares em necrose, correspondentes às "Hülsenzellen" das arteríolas tunicadas; estas áreas são em geral vazias de elementos inflamatórios, mas algumas vezes se encontram, dentro delas, aglomerados de leucócitos pseudoeosinófilos. 2) focos inflamatórios representados por aglomerados de pseudoeosinófilos sobre fundo mal corado; nesses focos é possivel distinguir nitidamente bactérias alongadas.

Não se encontram células gigantes envolvendo as zonas de necrose e inflamação observadas no baço. Nos vasos e nos seios, grande quantidade de pseudoeosinófilos.

Coração. O folheto parietal do pericárdio e o miocárdio apresentam certo grau de edema e infiltração por leucócitos pseudoeosinófilos.

Mucosa do céu da boca. O exame histológico da mucosa do céu da boca, que se apresentava, ao exame macroscópico, espessada e recoberta de algumas placas mais ou menos aderentes, cremosas, revela o seguinte: toda a mucosa é séde de edema inflamatório. As glândulas mostram processo inflamatório agudo, com destruição do epitélio, entupida a alma do orgão por substância necrótica, piócitos e bactérias em enorme quantidade (não há sinais de avitaminose A) O epitélio apresenta ainda diversas ulcerações pequenas.

Tecido subcutâneo da cabeça e seios. O tecido subcutâneo apresenta edema e infiltração de leucócitos pseudoeosinófilos, os quais, em certas zonas, formam grandes manguitos em torno de vasos. O tecido frouxo que fica abaixo do seio maxilar apresenta extensas zonas de necrose; o epitélio cutâneo correspondente a estas zonas mostra sinais de degeneração, com enormes vesículas. O seio maxilar apresenta-se cheio de exsudato inflamatório (abundância de pseudoeosinófilos), e seu epitélio mostra-se vacuolizado, degenerado e destruido em certas áreas.

B. INFECÇÃO EXPERIMENTAL. Pintos de 1 dia (Mortos de 24 a 96 hs.). As lesões observadas não se repetiram constantemente em todos os pintos; ocorreram de maneira irregular, de modo que não é possivel apresentar como típico nenhum quadro particular. Em cinco pintos mortos 24 hs. após inoculação da amostra C notava-se enfarte hemorrágico grande em um dos pulmões. No corte histológico nota-se a alma dos parabrônquicos e infundíbulos entupida de células epiteliais descamadas, monócitos e pseudoeosinófilos. A área enfartada tinha o aspeto peculiar dos processos desse tipo, com uma zona central de necrose onde ainda se veem restos de estrutura pulmonar, elementos do sangue e grande quantidade de bactérias, e uma zona periférica de congestão, fazendo transição para o tecido normal. Abundância de germes no pulmão, alguns fagocitados. Dos pintos inoculados com amostra A, só um apresenta alterações dessa ordem nos pulmões (morte em 48 horas).

Nos pintos de ambos os lotes, que morrem em prazos maiores, nenhuma alteração se encontra no pulmão.

Fígado. Macroscopicamente não havia alterações aparentes, apresentando-se o fígado com o amarelo estriado de vermelho, que é normal. Em alguns pintos a consistência do fígado estava aumentada.

Microscopicamente notavam-se áreas salpicadas de necrose e reações inflamatórias agudas nos canais biliares. Os vasos e seios, grandemente distendidos, com abundância de células inflamatórias, notando-se em torno deles proliferação de germes.

Rim. Em geral apresenta-se fortemente congesto, ressaltando muito nítidos os vasos da cápsula.

Saco vitelino. Ainda não reabsorvido, alterado muitas vezes, com conteudo acastanhado; mas o germe não se isola em caso algum.

Baço. Em um dos pintos mortos em 4 dias, o baço apresentava-se aumentado e com pontilhado branco bem visivel. Este baço mostra desaparecimento dos folículos e grande proliferação de células reticulares, assim como maciços bacterianos em meio destas.

Tecido subcutâneo. Edema, observado em alguns pintos.

Pintos de 10 dias. Os dois pintos inoculados, que morreram respetivamente em 11 e 33 dias, apresentavam pontilhado hemorrágico no rim. Em um deles, edema da face, e noutro, distensão da vesícula biliar.

Microscopicamente observa-se o seguinte:

Coração. Pericardite (maciços de pseudoeosinófilos no folheto visceral do pericárdio).

Baço. Proliferação de células reticulares em torno das arteríolas e indícios de necrose nestas células.

Fígado. Focos de necrose de coagulação. Neoformação de canalículos biliares e reação inflamatória nos canais biliares. Área de hemorragia e trombos com necrose incipiente em torno.

Rins. Na cortical, proliferação evidente das células dos glomérulos e grandes áreas de hemorragia e edema, entre os lóbulos e entre os túbulos. Na cápsula, hemorragia e edema.

Na zona medular, degeneração do epitélio dos túbulos e edema em torno dos vasos.

No pinto que morreu em 33 dias, início de esclerose dos glomérulos e hemorragias intersticiais.

EPIDEMIOLOGIA

Embora não houvessemos tido oportunidade de apurar no local quais as fontes possiveis de infecção para o surto por nós estudado, tudo leva a crer que a infecção haja sido causada pela ingestão de alimentos poluidos. Uma vez que o germe é eliminado pelas fezes, é facil compreender que, existindo alguns animais doentes, a molestia se possa propagar ao restante do lote, graças à poluição da agua e dos alimentos pela materia fecal dos doentes.

DISEASE IN CHICKS CAUSED BY "PSEUDOMONAS AERUGINOSA"

Abstract

The author reports an outbreak of a disease which was responsible for the loss of 19 chicks out of a flock of twenty.

Under certain aspects, the disease seems very close to that described by Essex and co-workers in 1930.

P. aeruginosa was found to be the cause of the disease and shown to be able to reproduce the disease experimentally when inoculated per os either in day or 10 days old chicks; Essex and coworkers did not succeed in their attempts to induce the disease by this route.

The paper describes the biological characteristcs of the strain of P. aeruginosa isolated and the lesions met with in the infected chicks.

BIBLIOGRAFIA

ESSEX, H. E., MC KENNY, F. D. e MANN F. C. — 1930 — *Pseudomonas pyocyanea* a significant factor in a disease of chickens. *Jour. Amer. Veter. Med. Ass.*, 30, 174-184.

MC COLLUM, E. V., SIMMONDS N., SHIPLEY P. G. e PARK E. A. — 1922 — Studies on experimental rickets. XVI — A delicate biological test for calcium depositing substances. *Jour. Biol. Chem.*, 51, 41-49.

REIS E NÓBREGA P. — 1936 — *Doenças das Aves.* (Tratado de Ornitopatologia), ed. I. Biológico, S. Paulo, pag. 151.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

(Salvo indicação diferente, as fotografias são de A. Federman)

Estampa 33

Fig. *A* — Pinto infetado *per os* com cultura de B. piociânico (foto Reis).

Fig. *B* — Cabeça de pinto infetado *per os* com cultura de B. piociânico. Edema da cabeça (Foto M. Mazza).

Estampa 34

Fig. *C* — Colônias de B. piociânico em agar. (Foto B. Mazza).

Fig. *D* — Corte frontal de cabeça de pinto com infecção espontânea. Exsudato no seio maxilar, infiltração do tecido perissinusal. (Foto B. Mazza).

Fig. *E* — Ulceração no epitélio do céu da boca de pinto com infecção espontânea.

Estampa 35

Fig. *F* — Degeneração do epitélio do céu da boca, ao nivel do tecido perissinusal grandemente infiltrado.

Fig. *G* — Glândula do céu da boca, com processo inflamatório.

Estampa 36

Fig. *H* — Tecido perissinusal da cabeça de pinto com infecção espontânea, mostrando edema e intensa infiltração de células inflamatórias.

Fig. *I* — Miocárdio, focos inflamatórios (células histiocíticas). Doença espontânea.

Estampa 37

Fig. *J* — Parabrônquio cheio de exsudato inflamatório e hemorrágico. Caso experimental.

Fig. *L* — Cápsula do rim, com hemorragia, caso experimental.

Fig. *M* — Hemorragia no tecido interpiramidal do rim, caso experimental.

Estampa 38

Fig. *N* — Foco de necrose pura do fígado, caso experimental.

Fig. *O* — Extensa área de necrose e inflamação do fígado (maciço de pseudoeosinófilos no centro), caso experimental.

Estampa 39

Fig. *P* — Área de exsudação e hemorragia no fígado, caso espontâneo.

Fig. *Q* — Colangite e pericolangite; áreas de necrose e proliferação de pseudocanalículos biliares. Caso espontâneo.

Estampa 40

Fig. *R* — Nódulo inflamatório com coroa de gigantócitos e cápsula fibrosa, caso espontâneo.

Fig. *S* — Corte do baço, mostrando alguns focos inflamatórios, caso espontâneo.

Fig. *T* — Baço, foco inflamatório, com bacilos. (Des. de L. Althausen).

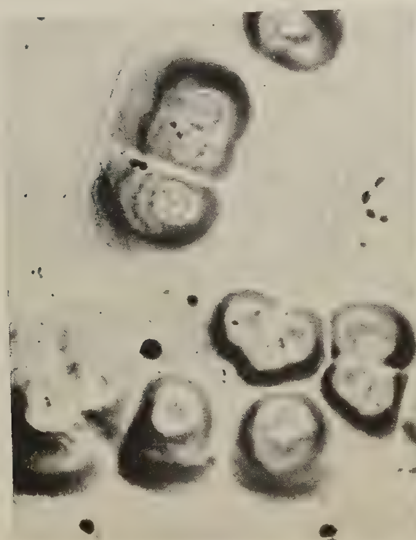
———o———



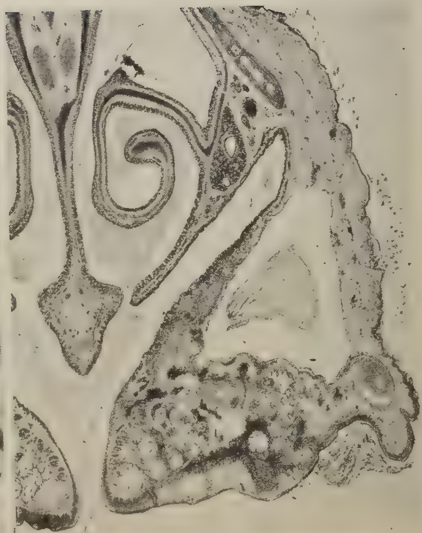
A



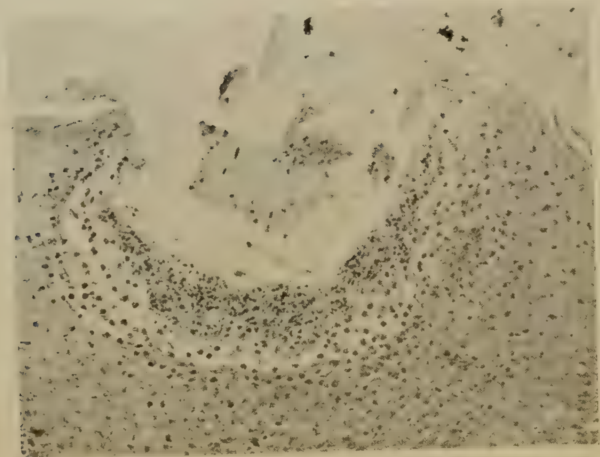
B



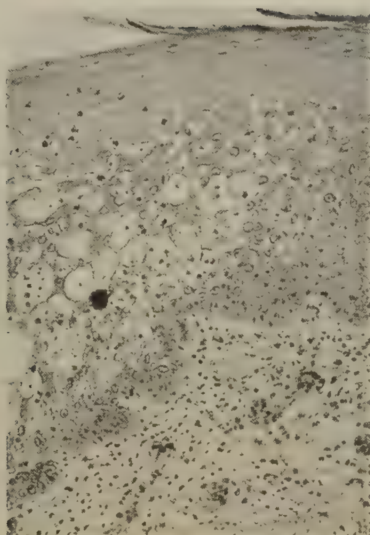
C



D



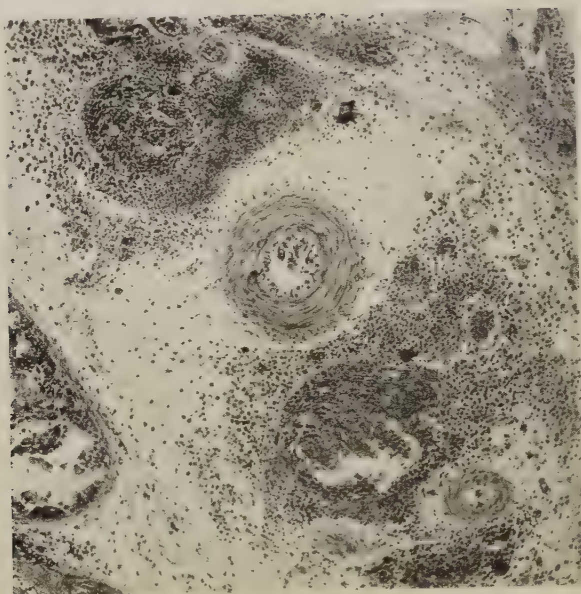
E



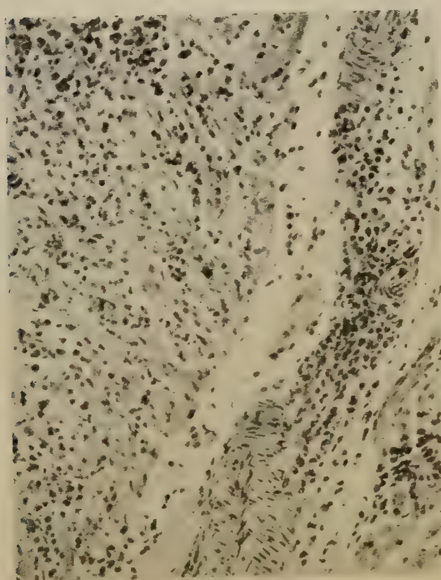
F



G

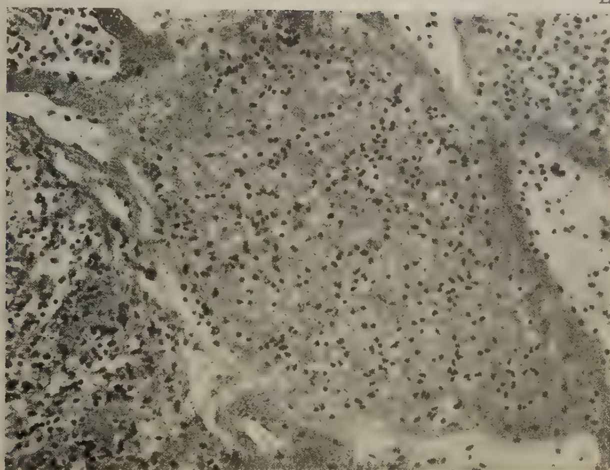


H

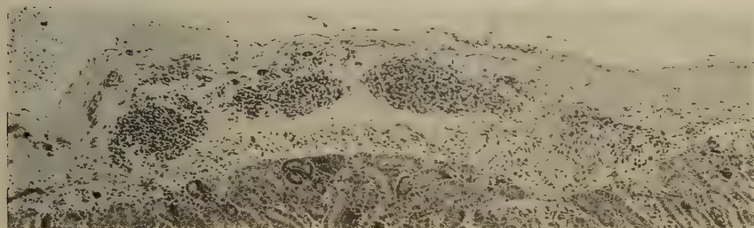


I

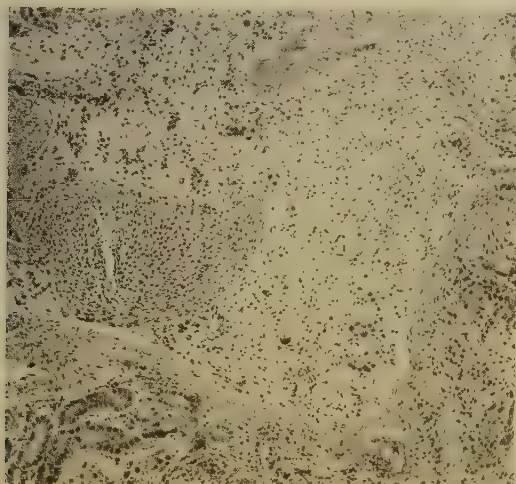
Estampa 37



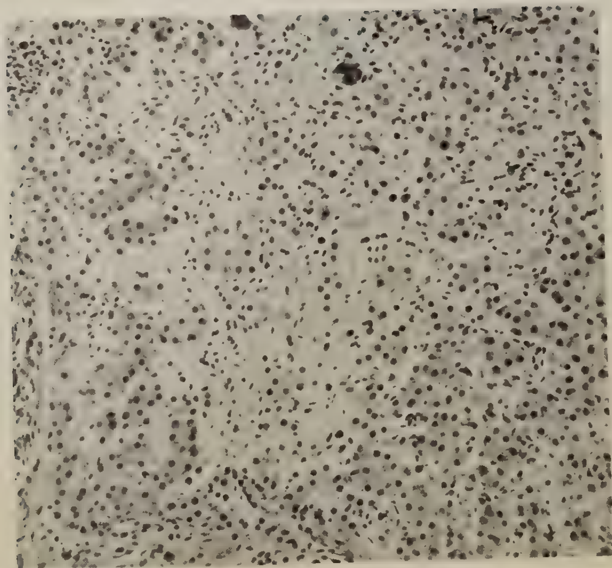
J



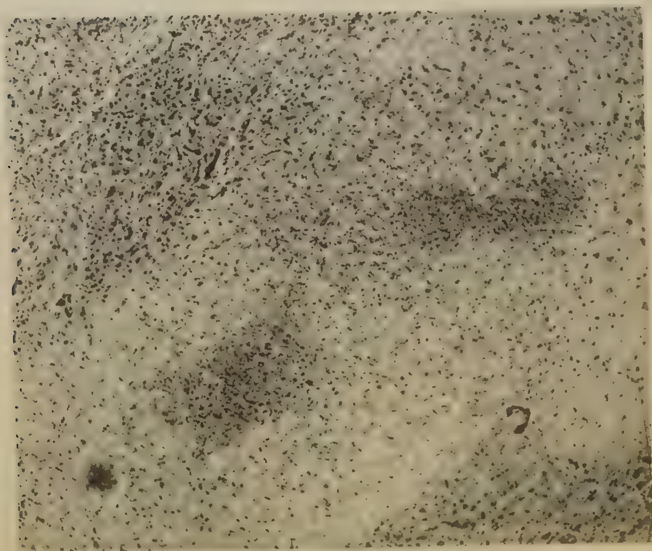
L



M



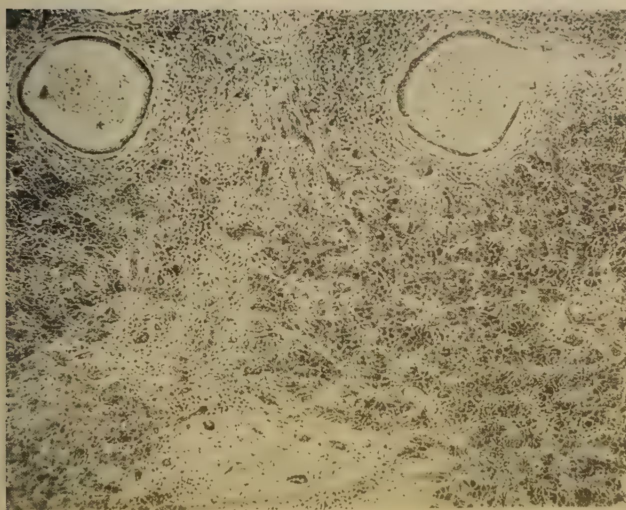
N



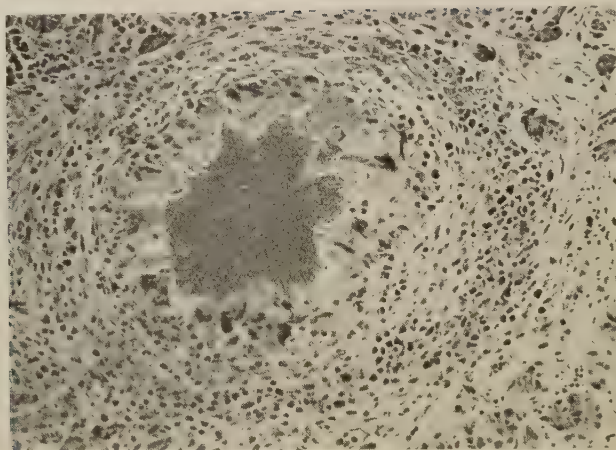
O



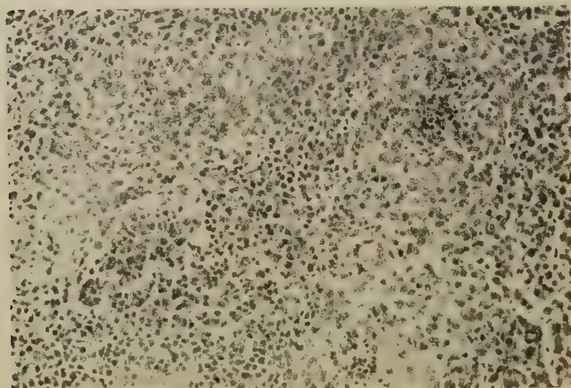
P



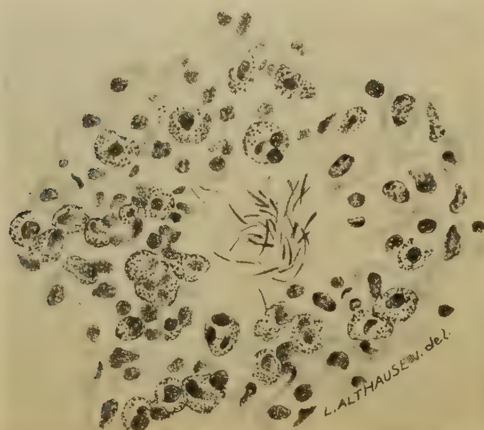
Q



R



S



T

Vol. 12 — Art. 13 Novembro de 1941

O CHOQUE TRIPTICO

POR

M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

INTRODUÇÃO

Apresentamos aqui uma vista de conjunto dos trabalhos que realizamos sobre as propriedades fisiológicas e farmacológicas da tripsina. A tripsina, em doses minimas, exerce uma ação hipotensora nitida quando injetada na veia de cães, gatos e coelhos. Doses maiores podem produzir a morte por colapso circulatório. Em trabalhos anteriores (41, 42) mostramos que 1 a 2 mgs por quilo, injetados na veia de um gato sob anestesia, é aproximadamente a dose minima letal, produzindo colapso e morte dentro de 10 a 20 segundos. A dose letal para o coelho é cerca de 2 a 3 vezes maior, sendo necessario injetar 3 a 5 mgs por quilo para produzir colapso e morte. No cão anestesiado, a injeção de 1 a 3 mgs por quilo produz profundo choque, não raro conduzindo à morte. No coelho e no gato, um aumento nitido da pressão no tronco da arteria pulmonar coincide com a quéda mortal da pressão carotidiana. No cão, a injeção de uma pequena dose diretamente num dos ramos da veia porta, conduz a uma quéda da pressão carotidiana 4 a 5 vezes maior do que a observada pela injeção da mesma dose na veia femural. A analogia com o que ocorre no choque anafilatico nessas tres especies animais, ou pela injeção de venenos animais, como de cobra, de escorpião e de abelha, foi repetidamente salientada em publicações anteriores (44). A capacidade da tripsina de produzir uma libertação de histamina do pulmão isolado de cobaia (42), o aparecimento de grandes quantidades de histamina no sangue e diminuição do conteúdo histaminico no figado de cães injetados com tripsina (38), são evidencias substanciais de que *in vitro* e *in vivo*, a tripsina póde mobilizar a histamina préviamente ligada aos tecidos. Outras evidencias dessa mobilização de histamina foram dadas pelos efeitos da tripsina sobre a musculatura lisa de numerosos órgãos de mamiferos, como intestino e útero de cobaia, intestino de gato, de cão e de rato. A energica contração produzida pela tripsina, seguida rapidamente de dessensibilização e precedida de um nitido tempo de latencia, evocam os mesmos efeitos produzidos pelo antigeno sobre o intestino e útero de cobaia e os efeitos produzidos pelos venenos animais sobre numerosos musculos lisos de mamiferos, efeitos esses usualmente interpretados como consequentes de uma libertação de

(1) Trabalho realizado sob um *Fellowship* da John Simon Guggenheim Mem. Foundation.

histamina. A prova de que a contração do intestino e útero isolados de cobaia, produzida pela tripsina, é mediada por uma libertação de histamina, foi dada pela ação inibidora que exerce sobre a contração produzida pelo enzima, a adição, ao banho de Tyrode, de determinadas quantidades de arginina ou histidina ou pelo prévio envenenamento do musculo com altas doses de histamina. ACKERMANN & COL. (2) mostraram a especificidade, em relação à histamina, da ação inibidora exercida pela arginina e histídina sobre o intestino e útero de cobaia. BARSOUM & GADDUM (4) verificaram que o musculo liso envenenado por altas doses de histamina, deixa de reagir à adição de pequenas doses de histamina, que antes produziam energica contração. Verificamos (41) que a tripsina, adicionada ao banho contendo um fragmento de útero de cobaia préviamente envenenado por fortes doses de histamina, não produz a habitual contração; depois de repetidas lavagens, o musculo volta a reagir à mesma dose de tripsina.

Os resultados referidos abaixo foram obtidos seguindo uma linha de pesquiza sugerida pela impressionante analogia existente entre os efeitos da injeção do antigeno num animal sensibilizado e o choque produzido no coelho, no cão e no gato, pela injeção de tripsina. Esses trabalhos foram feitos em colaboração com o Prof. C. A. Dragstedt, no Dep. de Fisiologia e Farmacologia da Northwestern University, em Chicago, e publicados em diversos artigos (16, 46, 47, 48).

EFEITOS TOXICOS DA TRIPSINA NO COELHO

Nesta especie animal, dois fatos cardiais ocorrem como consequencia da crise anafilatica: uma marcada leucopenia e uma diminuição do conteúdo histaminico no sangue circulante. ROSE & WEIL (49) mostraram que durante o choque anafilatico no coelho, a histamina total do sangue passa de valores elevados (2 a 5 γ por cc) antes da injeção do antigeno, para valores muitas vezes 10 vezes menores (0,3 a 1 γ por cc). Essa diminuição impressionante do conteúdo histaminico do sangue do coelho no choque anafilatico, foi interpretada por KATZ (32) como sendo consequencia de uma libertação de histamina dos globulos para o plasma e daí para os tecidos. A difusão rapida da histamina, do sangue para os tecidos, explicaria aquele decrescimo em histamina, cujo reservatorio mais importante no coelho é o sangue circulante, especialmente os leucocitos e plaquetas [CODE (9), CODE & ING (10), MINARD (36) e outros]. Posteriormente, DRAGSTEDT & COL. (15) mostraram que essa libertação de histamina dos globulos para o plasma e a leucopenia que sempre ocorre no choque anafilatico, dão conta da diminuição do conteúdo histaminico que ocorre no sangue do coelho, durante o choque anafilatico.

TABELA 1

Variações do conteúdo histaminico e do número de leucocitos, no sangue de coelhos injetados com tripsina

Coelho N.º	Dose de tripsina mg/Kg	Antes da injeção		Depois da injeção		Observações
		Numero de leucocitos	Histamina γ/cc	Numero de leucocitos	Histamina γ/cc	
1	← 3 a 7 mgs/kg →	—	5,2	—	0,4	Choque mortal
2		9.200	3,5	5,250	0,4	» »
3		12.700	6,0	5,250	2,0	Choque grave
4		6.550	9,0	3,200	4,5	Choque mortal
5		12.250	1,5	4,100	0,1	» »
6	12,5	Coagulação intravasolar				Choque mortal
7	25,0	» »				Choque mortal
8 *	25,0	Sangue fluido, ausencia de coagulos				Choque mortal

* O coelho N.º 8 recebeu uma injeção de 20 mgs de heparina antes da injeção de tripsina.

Verificamos (Tab. 1) que depois da injeção de tripsina na veia do coelho, uma enorme diminuição do conteúdo histaminico ocorre em todos os casos. O conteúdo histaminico que antes da injeção oscilava entre 1,5 e 9 γ por cc, depois da injeção, oscila entre 0,1 a 4,5 γ por cc. Em 3 dos coelhos, a redução foi de 10/1, em um dos coelhos, de 3/1, e no quinto coelho, de 2/1. Observamos igualmente marcada leucopenia, tendo sido a redução do número de leucocitos, em todos os casos, de 2/1 ou 3/1.

Em experiencias *in vitro*, mostramos que a tripsina, adicionada a uma amostra de sangue de coelho, determina uma difusão rapida da histamina, dos globulos para o plasma. Amostras de 10 cc de sangue heparinizado (1 mg de heparina) eram postas em contato com 1 ou 2 mgs de tripsina cristalina, e algumas mantidas como contrôle, sem tripsina. Depois de 10 minutos à temperatura ambiente ou a 37°, o sangue era centrifugado, o plasma cuidadosamente separado dos globulos e a histamina dosada no sangue total e no plasma, com e sem tripsina. O conteúdo histaminico do plasma, nas amostras que continham tripsina, era ordinariamente 2 a 3 vezes maior do que no plasma contrôle, sem tripsina. E' interessante essa analogia com o que ocorre no sangue do coelho sensibilizado posto em contacto *in vitro*, com o antigeno, como foi mostrado por KATZ (32).

EXPERIENCIAS NO CÃO NÃO ANESTESIADO

Injeções de tripsina, em quantidades apropriadas, no cão intacto, não anestesiado, reproduzem com exatidão os sintomas do cho-

que anafilatico, como foram descritas por RICHET. Alguns minutos depois da injeção intravenosa de 10 mgs de tripsina por Kg, o cão mostra sinais de grande desconforto, vomitos, relaxamento de esfincteres (miturição e defecação), sinais de colapso: deita no chão e permanece imovel. Ao fim de algum tempo apresenta defecações repetidas, terminando em diarréia sanguinolenta ao fim de 2 ou 3 horas. Com a dose indicada acima, na maioria dos casos, o recobro é completo ao fim de algumas horas. Se uma dose mais forte é injetada, a morte se produz ao fim de alguns minutos, aparentemente por colapso circulatorio. Num dos cães, em que injetámos 15 mgs de tripsina por quilo, a morte foi fulminante e uma pesquiza sistematica de coagulos sanguineos nas cavidades do coração, grandes vasos e veias abdominais, foi infrutifera, mostrando que a morte não poderia ter sido produzida por uma coagulação em massa, do sangue circulante.

A resistencia dos cães anestesiados à injeção de tripsina é consideravelmente maior que a de cães sob anestesia pelo éter, barbital ou nembutal. Nestes ultimos, uma injeção de apenas 2 ou 3 mgs de tripsina por quilo, produz um choque gravissimo, podendo conduzir à morte. Injeções de doses 2 a 3 vezes maiores, no cão não anestesiado são usualmente seguidas de sintomas passageiros e recobro rapido. Estes fatos estão em harmonia com a idéia de que o choque produzido pela tripsina é mediado por uma libertação de histamina dos tecidos. Essa mesma resistencia do animal não anestesiado, comparada com a sensibilidade do animal sob anestesia, póde ser observada no choque anafilatico e no choque produzido pela histamina. No caso do choque anafilatico podem ser citados os resultados obtidos por DRAGSTEDT & COL. (14) com algumas centenas de cães sensibilizados de uma maneira uniforme e submetidos ao choque anafilatico pela injeção de uma mesma dose de sôro de cavalo: em cerca de 30% dos casos os choques foram fatais, em 30% dos casos, severos ou gravissimos, e em 30%, benignos, com recobro rapido. Todas as experiencias foram realizadas sob anestesia pelo éter e barbital. BEAZELL & COL. (5) usaram as mesmas condições de sensibilização, submetendo os cães ao choque anafilatico, com a mesma dose de sôro, mas omitindo a anestesia. De 60 animais experimentados, apenas 1 morreu; na grande maioria dos casos as reações eram benignas. No caso do choque produzido por injeções de histamina, DALE (11) mostrou que gatos sob anestesia são muito mais sensiveis à injeção de histamina, que os não anestesiados. Assim, por exemplo, 10 mgs de histamina são suficientes para matar um gato submetido à anestesia, ao passo que a injeção da mesma dose em gatos normais, não anestesiados, produz apenas sintomas ligeiros e recobro rapido.

Essa maior resistencia do animal não anestesiado à injeção de tripsina, foi ainda posta em evidencia no coelho. 2 a 3 mgs de tripsina por quilo, são suficientes para produzir a morte de um coelho sob anestesia, ao passo que são precisos de 7 a 10 mgs por quilo para matar um coelho não anestesiado. Doses um pouco maiores produzem coagulação em massa do sangue nos grandes vasos (Tab. 1). Uma injeção prévia de heparina, entretanto, embora prevenindo a coagulação do sangue, não previne a morte por colapso circulatorio.

TRIPSINA E COAGULAÇÃO DO SANGUE

Desde os trabalhos antigos de DOUGLAS & COLEBROOK (13) e de HEARD (27) e os mais recentes de EAGLE & HARRIS (17) e de FERGUSON & COL. (24), é conhecida a ação coagulante da tripsina quando adicionada ao plasma oxalatado ou citratado. Em 1928, WALDSCHIMIDT-LEITZ & COL. (54) investigaram a ação coagulante da tripsina e admitiram a possibilidade de que a trombina fosse um fermento proteolitico semelhante à tripsina (53). A atividade coagulante da tripsina, negada por MELLANBY (35), foi "redescoberta" por EAGLE & HARRIS (17), que estudaram minuciosamente a questão, usando em algumas das experiencias a preparação cristalina de KUNITZ & NORTHROP (34). A incapacidade da tripsina de produzir coagulação de preparações purificadas de fibrinogenio, levou EAGLE & HARRIS (17) a admitir em que o fermento agiria como o complexo Calcio + Plaquetas (ou Calcio + Extracto de tecidos), transformando diretamente a protrombina em trombina. Baseados nessas experiencias com a tripsina, EAGLE & HARRIS postularam a existencia de fermentos proteoliticos no sistema Ca + Plaquetas (ou Ca + Extratos de tecidos). Essa ação da tripsina seria uma ação difasica, pequenas doses acelerando a coagulação e doses mais fortes produzindo uma permanente incoagulabilidade pela destruição de um dos elementos indispensaveis para a formação do precipitado de fibrina. A ação coagulante da tripsina foi reinvestigada por FERGUSON & ERICKSON (24, 25), que mostraram a importancia de se adicionar calcio e cefalina ao sistema tripsina + plasma oxalatado, para evidenciar a ação tromboplastica de pequenas doses de tripsina. O papel que agentes tromboplasticos como a tripsina e extratos de órgãos, podem desempenhar na coagulação do sangue, foi discutido extensamente por FERGUSON & ERICKSON (24), que admitiram a hipótese de que a tripsina agiria, da mesma forma que extratos de órgãos, mobilizando calcio e cefalina de uma hipotética combinação com a protrombina. Alguns pontos de contacto entre a ação da tripsina e a de extratos de órgãos, tornam essa hipotese particularmente sedutora. A ação lítica de extratos de pulmão sobre a

protrombina presente no sangue citratado, é analoga à ação trombinolitica exercida pela tripsina ou pelo sôro sanguineo. Além disso a presença de proteases em todos os sistemas sabidamente tromboplasticos tem sido verificada repetidamente. SCHMITZ (50) isolou tripsina do plasma sanguineo e IZUMI & COL. (30) apresentaram evidencias de uma atividade proteolitica nos extratos de pulmão. Recentemente GLAZCO & FERGUSON (26) estudaram a cinetica de inativação de preparações purificadas de trombina não só pelo sôro normal, como tambem pela adição de tripsina, mostrando uma estreita semelhança entre o efeito trombinolitico da tripsina e o da triptase sérica.

Póde-se concluir que a tripsina em pequenas doses acelera a coagulação *in vitro* do plasma citratado ou oxalatado, provavelmente pela libertação de calcio e cefalina de um complexo proteina-calcio-fosfolipido. Em doses mais fortes, destróe um dos elementos indispensaveis para o processo de coagulação, determinando uma permanente incoagulabilidade do plasma. Segundo EAGLE & HARRIS (17), uma preparação de tripsina comercial coagúla o plasma citratado em doses compreendidas entre 10 e 100 mgs por 0,6 cc de plasma. Doses superiores a 100 mgs produzem incoagulabilidade por destruição da protrombina. Doses inferiores a 10 mgs têm um efeito minimo ou nulo sobre o tempo de coagulação do plasma. Pelos dados de EAGLE & HARRIS, a tripsina cristalina, segundo KUNITZ & NORTHROP, seria 20 a 50 vezes mais ativa.

O efeito da heparina na coagulação do plasma citratado pela tripsina, foi estudado por FERGUSON (22, 23). A tripsina na dose de 0,05 mg por 1 cc de plasma, póde corrigir parcialmente o efeito anticoagulante de 0,1 mg de heparina. A mesma dose de tripsina, entretanto, não póde contrabalançar o efeito de 0,5 mg de heparina, exceto no caso de se adicionar cefalina ao sistema. As condições experimentais com o sangue total, são certamente diferentes das condições experimentais com o plasma citratado e os resultados obtidos por FERGUSON apenas parcialmente são aplicaveis às condições das nossas experiencias. Verificamos que 1 mg de heparina adicionado ao sangue total (5 cc) de coelho, é suficiente para proteger de maneira completa o efeito coagulante de 1 a 2 mgs de tripsina cristalina. A adição de uma nova dose de tripsina póde produzir uma coagulação massiça, o que mostra que nenhum dos componentes do sangue, indispensaveis à coagulação, tinha sido destruido pela ação proteolitica da tripsina. Em experiencias *in vivo* (16), a injeção de 20 mgs de heparina, em coelho de 2,5 quilos, previne de maneira completa o efeito coagulante de 40 ou 50 mgs de tripsina injetados na veia.

Pelos dados indicados acima, fica bem claro que a injeção de 2 a 3 mgs de tripsina cristalina por quilo, em cão, não póde ter nenhum efeito coagulante *per se*, porquanto é uma dose muito fraca (cerca de 0,01 ou 0,02 mg por cc de sangue) para acelerar a coagulação e evidentemente uma dose muito aquém do limite acima do qual a tripsina passa a ter um efeito anticoagulante em consequencia de uma trombinolise massiça. Ora, em experiencias numerosas, observamos (47) um aumento consideravel do tempo de coagulação, podendo chegar à completa incoagulabilidade, em seguida à injeção em cães, de 2 a 3 mgs de tripsina cristalina por quilo. Acumulamos evidencias de que esse efeito anticoagulante da tripsina *in vivo* póde ser explicado por uma libertação de heparina, como acontece nos choques anafilatico e peptonico. Para isso, baseamo-nos no fato verificado por CHARGAFF & OLSON (8) de que a protamina inibe quantitativamente o efeito anticoagulante da heparina, quando ambas são injetadas em cães. Esse fato foi confirmado e estudado mais extensamente por JAQUES, CHARLES & BEST (31) que verificaram em experiencias concordantes, *in vivo* e *in vitro* que 33 unidades de heparina são contrabalançadas por 1 mg de protamina. Mais recentemente, WATERS, MARKOWITZ & JAQUES (55) aplicaram esses resultados ao estudo da incoagulabilidade do sangue nos choques anafilatico e peptonico e puderam dessa maneira traçar curvas do conteúdo em heparina do sangue em animais submetidos àquelas duas modalidades de choque. Verificamos que o tempo de coagulação aumenta consideravelmente após a primeira injeção de tripsina e que a adição *in vitro* de quantidades ótimas de protamina, tornam normal o tempo de coagulação. Adicionando-se determinado volume de sangue do animal submetido ao choque triptico, a uma serie de tubos contendo quantidades crescentes de protamina, pela observação do ótimo de protamina necessario para trazer ao normal o tempo de coagulação, foi possivel traçarem-se curvas do conteúdo em heparina do sangue circulante, em diversos tempos depois da injeção de tripsina, em tudo semelhante ao que foi observado para os choques anafilatico e peptonico.

Póde-se resumir, dizendo que doses de tripsina suficientes para produzir um choque severo ou a morte de cães, gatos e coelhos, estão muito aquém da dose minima necessaria para produzir coagulação em massa do sangue circulante. O retardo do tempo de coagulação do sangue de animais injetados com aquelas doses de tripsina póde ser explicado por uma descarga de heparina dos tecidos (provavelmente figado) para o sangue circulante. E' superfluo acrescentar que a quantidade de heparina libertada é suficiente não só para contraba-

lançar o proprio efeito tromboplastico do plasma sanguineo, como uma eventual ação coagulante da tripsina injetada.

A discussão desses fatos é importante para se compreender que o efeito toxico da tripsina, só excepcionalmente (doses muito fortes) póde ser posto em relação com o seu efeito coagulante. No gato, ficou muito nitido que a coagulação em massa, do sangue, não poderia explicar o efeito letal da tripsina. Uma a 2 mgs de tripsina por quilo, é aproximadamente a dose minima letal da tripsina nessa especie animal. Isso representa aproximadamente 0,01 a 0,02 mgs de tripsina pòr 1 cc de sangue, dose insuficiente para produzir *in vitro* qualquer efeito apreciavel sobre o tempo de coagulação do sangue. *In vivo,* o sangue se torna incoagulavel pelo menos por 20 ou 30 minutos e muitas vezes por 24 horas. No coelho, EAGLE & HARRIS (17) tinham mostrado que grandes doses de tripsina comercial produzem a morte, por uma coagulação massiça do sangue circulante. Verificamos fato semelhante, no coelho, (16) injetando tripsina cristalina em doses acima de 12 a 15 mgs por quilo. O animal morre quasi que instantaneamente. Feita a autopsia, são encontrados coagulos nos grandes vasos e nas cavidades do coração. Entretanto, uma injeção prévia de 20 a 30 mgs de heparina muda completamente o quadro da autopsia, mas não previne o efeito letal das grandes doses de tripsina. Depois da morte, o sangue se apresenta fluido, incoagulavel, e a autopsia revela grande dilatação do ventriculo direito e da arteria pulmonar, e ausencia completa de coagulos nos grandes vasos e nas cavidades do coração.

Fica claro portanto que o efeito letal da tripsina no gato e no coelho, não póde ser relacionado com o seu efeito coagulante. No cão, a injeção de 2 a 3 mgs de tripsina, sob anestesia, produz um profundo choque, muitas vezes conduzindo à morte. Doses 3 a 4 vezes maiores, injetadas no cão não anestesiado, podem ser praticamente inócuas, o que é mais uma evidencia de que o choque produzido pelas pequenas doses no cão sob anestesia não poderia ser explicado por uma coagulação nos pequenos vasos e capilares dos órgãos.

EXPERIENCIAS COM O TEST DO AZUL TRIPAN

Em colaboração, primeiro com O. BIER (7, 45) e recentemente com DRAGSTEDT (48), mostramos que a histamina produz um test positivo com o azul tripan e mostramos que varios extratos de tecidos produzem um test positivo que póde ser relacionado com o conteúdo histaminico deles (46). Como a pele do coelho contém quantidades consideraveis de histamina, pareceu-nos muito provavel que agentes que não contém histamina, mas têm a propriedade de libertar histamina dos tecidos vivos, podem produzir um test positivo com o azul tripan.

As observações de RAMSDELL (39) de que a injeção do antigeno no coelho sensibilizado conduz a um test positivo com o azul tripan é uma forte evidencia favoravel àquela interpretação, dada a capacidade do antigeno de libertar histamina dos tecidos do animal sensibilizado.

Geralmente, substancias inflamatógenas, mesmo moderadas, são capazes de produzir uma descarga de histamina dos tecidos. Injetados intradermicamente em coelhos, 5 minutos antes da injeção intravenosa de azul tripan, tais agentes produzem um acumulo do corante na area injetada. Essa reação, com um grande número de substancias inflamatórias, é nitidamente trifasica. Doses pequenas do irritante produzem uma acumulo homogeneo do corante sobre uma area relativamente extensa em torno do ponto de injeção. Doses médias produzem uma area central pálida ou ligeiramente hiperemica, circundada por um extenso halo azul. Grandes doses produzem forte hiperemia no centro, muitas vezes acompanhada de hemorragias e necroses e um extenso halo azul em torno.

Verificamos que as substancias capazes de libertar histamina dos tecidos, produzem um test positivo, trifasico, com o azul tripan (xilol, peptona, alcool, tripsina, venenos de cobra e de abelha, toxina estafilocócica, etc.). Substancias que não libertam histamina, como pepsina, acetil-colina, heparina, arginina, insulina, secretina, acido acetico, etc., nenhum acumulo de corante produzem quando injetadas intradermicamente em coelhos.

Uma evidencia muito sugestiva é o fato de produzir a histamina, em diluições superiores a 1/5.000, um acumulo homogeneo do corante, e em concentrações mais fortes, um halo azul circundando uma area branca muitas vezes hiperemica. A interpretação de que um test positivo com o azul tripan póde sugerir uma libertação de histamina da pele do coelho, torna o metodo do azul tripan um precioso auxiliar para verificar uma eventual capacidade de libertar histamina de uma substancia X qualquer. Entretanto, o caso por nós verificado, da calicreína (43), que produz um test positivo mas não possue a capacidade de libertar histamina dos tecidos, mostra a necessidade de se completarem as observações com o test do azul tripan com ensaios auxiliares, como a ação sobre o intestino isolado de cobaia, perfusão do pulmão de cobaia, etc. Ao contrario, um test negativo é uma forte evidencia de que a substancia considerada é incapaz de libertar histamina dos tecidos. Sob este aspeto, interessantes foram os resultados obtidos com duas amostras de peptona. Bacto-protona contém grandes quantidades de nitrogenio proteósico, é capaz de desencadeiar grave choque peptonico no cão, e foi capaz de produzir grande acumulo de corante pelo test do azul tripan. Ao contrario, uma preparação de

Bacto-peptona, contendo pequenas quantidades de nitrogenio proteósico, incapaz de produzir um choque peptonico no cão, foi igualmente incapaz de produzir um test positivo com o azul tripan (48).

Os resultados que obtivemos com a tripsina, injetada intradermicamente em coelhos, 5 minutos antes de uma injeção intravenosa de azul tripan, constituiu mais uma evidencia da libertação da histamina dos tecidos produzida pelo agente triptico. Doses compreendidas entre 0,5 e 1,5 mgs de tripsina injetada intradermicamente, produzem um acumulo homogeneo de corante; doses acima de 1,5 mg produzem um halo azul circundando uma area descorada e mais ou menos hiperemica; doses muito fortes produzem uma area de hemorragias e necroses circundada por um halo azul extenso. O mesmo aspecto foi obtido com venenos animais como os de cobra (*Crotalus t. terrificus, Crotalus atrox, Bothrops atrox, Arkistrodon piscivorus*, etc.) e de abelha (48). Ao passo que a mancha azul homogenea, a area pálida central e o halo azul produzido por fortes concentrações de tripsina e venenos animais, podem ser explicados por uma libertação de histamina, os efeitos hemorragicos e necrotizantes superimpostos devem ser explicados como produzidos pela ação direta e especifica de tais venenos, porquanto a injeção mesmo de fortes doses de histamina (2 a 5 mgs por 0,3 cc) não produz hemorragias e necroses na zona central circundada pelo halo azul.

EXPERIENCIAS COM O "INHIBITOR-TRYPSIN COMPOUND"

Admitimos (41) que a libertação de histamina produzida pela tripsina fosse um primeiro degráu no desdobramento das proteinas tissulares. A adição ao banho de Tyrode de uma pequena quantidade de tripsina, teria como efeito libertar toda a histamina frouxamente ligada a uma primeira capa de proteinas diretamente agredida pelo fermento. Uma segunda descarga de histamina só seria possivel em seguida à destruição total daquela primeira capa de proteinas. Durante o tempo necessario para a digestão dessa primeira camada, o musculo se mostraria dessensibilizado. A simples combinação da molecula de tripsina com a molecula proteica, o que parece constituir o primeiro degráu na ação proteolitica do fermento, poderia determinar uma perturbação na estructura coloidal das proteinas celulares, suficiente para produzir uma descarga da histamina frouxamente ligada a um hipotetico complexo lipo-proteico celular [RIDEAL & SCHULMAN (40), FELDBERG (18)].

A demonstração, entretanto, de que a atividade farmacológica da tripsina é produzida pela sua atividade proteolitica, só recentemente foi dada, de maneira definitiva. Tentamos inicialmente inativar pelo

calor o preparado cristalino de tripsina, sem resultado. A resistencia da tripsina cristalina a um aquecimento prolongado foi salientada por KUNITZ & NORTHROP (34). Nas nossas experiencias, mesmo uma ebulição por 5 minutos era praticamente incapaz de alterar de maneira apreciavel as propriedades farmacológicas da tripsina. Depois da ebulição, nenhum sinal de coagulação de proteinas podia ser observado, permanecendo limpida a solução depois desse tratamento. Um aquecimento mais prolongado que coagulasse de maneira irreversivel a proteina do fermento não seria um meio decisivo de resolver a questão, porquanto a tripsina desapareceria da solução por filtração.

Em 1935, KUNITZ & NORTHROP (34) cristalizaram uma substancia que foi designada com o nome de *Trypsin-Inhibitor*, de peso molecular cerca de 6.000 e capaz de combinar em proporções moleculares com a tripsina (de peso molecular cerca de 36.500) produzindo um composto — *Inhibitor-Trypsin Compound* — destituido de propriedades proteoliticas. Experimentamos os efeitos farmacológicos de um preparado cristalino do *Inhibitor-Trypsin Compound*, preparado de acordo com técnica de KUNITZ & NORTHROP e fornecido pela firma *Lehn & Fink Products Co., Bloomfield, N. J.* com o fim de verificar se a atividade farmacológica da tripsina está realmente ligada ao seu poder proteolitico. Fizemos ensaios sobre o intestino de cobaia, sobre a pressão arterial do gato e com o test do azul tripan. Uma mg de *Inhibitor-Trypsin Compound* contém teoricamente cerca de 0,85 mg de tripsina cristalina. Experimentamos o *Compound* em doses 2 a 3 vezes maiores do que a dose de tripsina necessaria para produzir uma energica contração do intestino isolado de cobaia, com resultado absolutamente negativo. Da mesma forma, a injeção intravenosa em gatos, de doses compreendidas entre 3 a 10 mgs, nenhum efeito produziu sobre a pressão arterial. Injetado o *Compound* intradermicamente em coelhos, 5 minutos antes da injeção intravenosa de azul tripan, nenhum acumulo de corante na area injetada, foi observado.

Dessas experiencias negativas, póde-se concluir como muito provavel que a atividade farmacológica da tripsina está ligada ao seu poder proteolitico, restando ainda uma possibilidade de que a modificação da estructura molecular do enzima, pela combinação com o *Inhibitor*, possa alterar uma eventual toxidez primaria, ligada à molecula da tripsina.

DISCUSSÃO

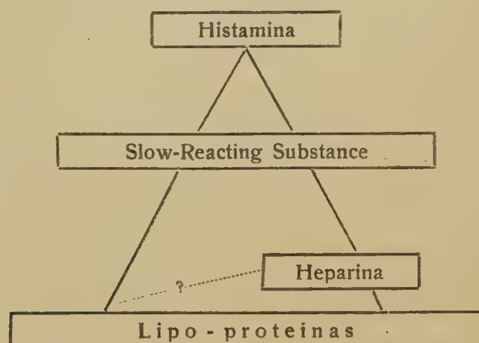
E' tal a semelhança entre os efeitos produzidos pela tripsina e os produzidos pela peptona, venenos animais e antigeno nos animais sensibilizados, que uma discussão do mecanismo pelo qual a tripsina

liberta histamina dos tecidos não pode deixar de apresentar alguns pontos de contacto com o mecanismo da libertação de histamina em qualquer outra instancia. A idéia de que o choque anafilatico está ligado à ativação de fermentos proteoliticos, não é nova, e vem claramente delineada nos trabalhos de VAUGHAN (52), PFEIFFER & JARISCH (37), ABEL & KUBOTA (1) e muitos outros. Entretanto, o ponto de vista de que a digestão do antigeno libertasse uma toxina ou mesmo histamina, ou a idéia de que a clivagem das proteinas séricas poderia originar histamina por uma alteração molecular da histidina, ou ainda a hipotese, muitas vezes admitida, de uma especificidade em relação ao antigeno, dos fermentos proteoliticos postos em ação durante a crise anafilatica, desmoralizaram uma a uma todas as teorias propostas, e DALE (12), em 1929, embora admitindo a possibilidade de que uma proteolise fosse o preludio da crise anafilatica, foi obrigado a fazer a seguinte limitação: *There is no convincing evidence, either of an immediate protein digestion resulting from the union of the antigen with the antibody or of the liberation of histamine in the enzymatic cleavage of proteins.* Realmente varias experiencias tinham demonstrado que a destruição enzimatica de uma proteina purificada, como a caseina ou a edestina, é incapaz de originar histamina, e nenhuma das proteinas conhecidas em estado de pureza contém, na sua molecula, uma molecula de histamina preformada. A histamina que se origina ao nivel dos tecidos pela ação do antigeno, ou pela ação citolitica de venenos animais, ou pela ação da peptona ou da tripsina, está frouxamente ligada às proteinas celulares, e essas conexões não resistem a qualquer processo de extração e purificação delas. Por outro lado, qualquer agente inflamatório, mesmo os mais benignos, posto em contacto com a celula viva, é capaz de produzir uma descarga quasi instantanea dessa substancia, o que mostra a extrema accessibilidade da camada de lipo-proteinas à qual está ancorada essa substancia e a extrema liabilidade das suas conexões com as substancias celulares. Assim, a maneira de encarar a questão do eventual papel dos fermentos proteoliticos no choque anafilatico, é hoje consideravelmente diferente do que era há 20 ou 30 anos atrás. A demonstração de que um agente proteolitico, ativo em condições de pH da celula viva (tripsina) é capaz de produzir uma descarga de histamina sugere que agentes proteoliticos existentes em todas as celulas (catepsinas, proteases) pódem produzir fenomeno semelhante desde que certos fatores antagonistas (antitripsina, antiproteases) sejam inativados. A maioria dos fermentos proteoliticos intracelulares, embora exigindo condições de pH peculiares (pH entre 4 e 5) provavelmente entram em ação em condições especiais, porquanto a sintese de proteinas celulares deve estar em relação

com a atividade deles [BERGMANN & COL. (6)]. Nas condições normais da célula, é ainda um misterio o mecanismo pelo qual eles entram em ação, mas é fóra de duvida que quando a célula é lesada (inflamação, necrose, etc.) produz-se um consideravel aumento de velocidade da autolise celular, o que significa que os fermentos proteoliticos intracelulares são postos em atividade. Ora, no choque anafilatico, em certas condições, extensas lesões celulares pódem ser observadas (fenomeno de ARTHUS), o que poderia ter como *background* uma inicial ativação dos fermentos proteoliticos intracelulares. Uma discussão detalhada das diversas hipoteses apresentadas para explicar o mecanismo da libertação de histamina frouxamente ligada aos complexos lipo-proteicos celulares, póde ser encontrada em recente trabalho de FELDBERG (18). Resumimos aqui as conclusões mais importantes. Fatores que alteram as proteinas ou os lipoides celulares teoricamente podem produzir uma descarga de histamina. Fatores como ebulição [TRETHEWIE, (51)] ou metais pesados como $HgCl_2$ [HEUBNER & BACHMANN (28), BACHMANN (3), FELDBERG & KELLAWAY (20)] libertam histamina dos tecidos, aparentemente em virtude de uma coagulação das proteinas tissulares. Por outro lado, uma enzima como a lecitinase, que ataca diretamente a parte lipoidica dos complexos lipo-proteicos celulares, conduz a uma libertação de histamina [FELDBERG & KELLAWAY (21)]. A ação de venenos animais, como de cobra e de abelha, é certamente mais complexa porquanto tais venenos contém ao mesmo tempo fermentos proteoliticos e lecitinase, podendo portanto agredir um ou outro dos constituintes do complexo. O mecanismo de libertação de uma substancia designada por FELDBERG & KELLAWAY, *Slow-Reacting Substance*, é ainda obscuro, mas essa substancia tem sido encontrada em perfusatos de órgãos sensibilizados, tratados pelo antigeno [KELLAWAY & TRETHEWIE (33)] ou de órgãos normais perfundidos com venenos de cobra e de abelha [FELDBERG & KELLAWAY (21), FELDBERG, HOLDEN & KELLAWAY (19)] e parece acompanhar a libertação de histamina dos tecidos, de maneira constante. HOLDEN (29) mostrou que a tripsina é capaz de libertar a *Slow-Reacting Substance* quando posta em contacto com a gema de ovo, o que induz a acreditar que, da mesma maneira que a histamina, essa substancia esteja ancorada aos dois componentes do complexo lipo-proteico celular. A libertação de heparina tem sido observada nos choques anafilatico, peptonico e triptico, faltando ainda evidencias de que seja igualmente libertada por agentes como a lecitinase, que agride de preferencia a parte lipoidica do complexo.

Apresentamos o esquema seguinte como uma tentativa de visualização desse complexo formado pela camada lipo-proteica celular e as

substancias farmacologicamente ativas: Histamina, *Slow-Reacting Substance* e heparina, libertadas pela ação de substancias como lecitinase, lisolecitina, tripsina, peptona, antigeno e venenos animais.



Este esquema, embora assentado sobre hipoteses, é o mais completo que se poderia construir com os dados conhecidos. Não temos elementos para admitir que exista mais do que uma simples "contiguidade" entre a histamina, a *Slow-Reacting Substance* e a heparina, nas suas conexões com os complexos lipo-proteicos celulares. Admitir que a *S. R S.* ou a heparina são os élos que fixam a histamina às proteinas celulares, seria talvez uma bôa hipotese, mas sem nenhuma base experimental.

TRYPTIC SHOCK

Abstract

We are reviewing in this paper the recent additional observations on the pharmacological and physiological effects of trypsin.

1) *Liberation of histamine by trypsin. The capacity of trypsin of liberating histamine from the tissues seems to be the main factor in determining its several and hiphly interesting pharmacological effects. The proofs of this histamine release by trypsin are: a) the in vitro liberation of histamine from the guinea pig lung perfused with solutions of the enzyme; b) the ability of trypsin to produce a shift of the histamine from cells to plasma, when the enzyme is put into contact with samples of heparinized rabbits blood; c) the contraction of several smooth muscle structures, when put in vitro in contact with the tryptic ferment and the desensitization which follows the addition of a first, small dose of the enzyme; d) arginine and histidine which have been shown to counteract the effect of histamine upon the smooth muscle, counteract the*

effect of trypsin in analogous conditions; e) the astonishing similarity between the pharmacological effects of trypsin on the circulatory apparatus of cats, rabbits and dogs (tryptic shock) and those produced by the injection of the antigen; f) the appearance of high amounts of histamine in the circulating dogs blood and the vanishment of the liver histamine, when the animal is injected intravenously with trypsin; g) trypsin produces a positive trypan blue test, when injected intradermally in rabbits short time before the intravenous injection of the dye, in the same way as any other histamine liberating substance does.

2) *Toxic effects of trypsin in the rabbit. In addition to those facts elsewhere reported, we have shown that the injection of trypsin into the vein of anesthetized and unanesthetized rabbits is followed by marked leukopenia and decrease of the histamine content of the blood. Similar facts were observed in sensitized rabbits following the injection of the antigen and were interpreted as consequent of a diffusion of histamine from the cells to the plasma.*

3) *Experiments with the unanesthetized dog. As far as we can tell, trypsin is the substance which in smaller doses duplicates all the symptoms of the anaphylactic shock in the cat, rabbit and dog. In addition, experiments with the unanesthetized dog have shown a striking similarity of the symptomatology described first by Richet, as typical of the anaphylactic shock in this animal species. Even the fact that we need to inject as much as 10 mgs of trypsin per kilo in the veins of an unanesthetized animal to produce severe shock, while we need only to inject 2 or 3 times less in the anesthetized animal to produce severe fall of blood pressure, is in perfect harmony with the hypothesis that trypsin exerts its effects through a mechanism similar to the mechanism of anaphylactic shock, since animals under anesthesia are far less resistant to anaphylaxis and histamine than the unanesthetized ones.*

4) *Liberation of heparin by trypsin. Following another line of experiments we have studied the effect of trypsin, injected intravenously, on the clotting time of the blood of several animal species. The conspicuous decrease in the coagulability of the blood or, in some cases, the complete incoagulability is another striking similarity between the trypsin effect and the effect of the injection of the antigen in a sensitized animal. Drawing of the blood after the injection of the ferment, and addition of protamin in optimal concentrations was followed by a decrease to the normal of the clotting time, this being a fairly good evidence that heparin is the substance which slows down the blood clotting after the injection of shocking doses of trypsin.*

5) *Experiments with the Inhibitor-Trypsin Compound. Finally, we studied the pharmacological effects of a substance crystallized by Kunitz & Northrop, the Inhibitor-Trypsin Compound. Since trypsin is present in this compound in an inactive form (non proteolytic), it was highly interesting to test this compound, comparatively with a crystalline trypsin preparation, on the guinea pig gut, the blood pressure of the cat and with the trypan blue test on the rabbit skin. While pure trypsin in every instance has shown its striking pharmacological properties, the Inhibitor-Trypsin Compound was completely inactive. This fact strongly suggests that the pharmacological activity of trypsin is in fact dependent upon its proteolytic activity. It is, however, necessary to emphasize that the prompt liberation of histamine is probably a first step in the process of breakdown of the tissular proteins and that certainly it is unnecessary for trypsin to produce any detectable digestion of the proteins to produce this almost instantaneous discharge of histamine loosely bound to the living tissues.*

6) *Discussion. Some considerations bearing on the mechanism of liberation of histamine in inflammation, anaphylactic shock and correlated instances, were made on the basis of an activation of the cellular proteolytic enzymes existing in every living cells. A hypothetical scheme is provided, as an attempt to vizualize the interrelations between the lipo-protein complex of the cells and the pharmacological active substances like histamine, "Slow-Reacting Substance" and heparin liberated by the antigen, animal poisons and trypsin.*

The experiments referred to above were mostly done under a Fellowship of the Guggenheim Foundation in Dr. Ivy's Department of Physiology and Pharmacology of the Northwestern University, in Chicago, in close collaboration with Dr. C. A. Dragstedt. I am indebted to both Dr. A. C. Ivy and Dr. C. A. Dragstedt for continuous encouragement and advice. For assistance and technical help I am indebted to Dr. G. O. Ojers, Dr. C. A. Holmes and Miss M. Lynch.

BIBLIOGRAFIA

1 — Abel, J. J. and S. Kubota — 1919 — On the presence of histamine in the hypophysis cerebri and other tissues of the body and its occurrence among the hydrolytic decomposition of proteins. *Journ. of Pharmac.* **13**, 243-300.

2 — Ackermann, D. und W. Wasmuth — 1939 — Zur Kenntnis der Beziehung des Histamins zum anaphylaktischen Schock. *Ztsch. f. physiol. Chem.* **260**, 155-162.

3 — Bachmann, H. — 1938 — Ueber die Freisetzung von Histamin bei Gewebsschaedigung durch Gifte. *Arch. f. exp. Path. u. Pharmak.* **190**, 345-355.

4 — Barsoum, G. S. and J. H. Gaddum — 1935 — Pharmacological estimation of adenosine and histamina. *Journ. of Physiol.* 85, 1-14.

5 — Beazell, J. M., Bradley, W. B. and A. C. Ivy — 1936 — Anaphylaxis in normal unanesthetized dog. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* 34, 231-232.

6 — Bergmann, M. and H. Fraenkel-Conrat — 1937 — The rôle of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. Synthesis with intra-cellular enzymes. *Journ. of Biol. Chem.* 119, 707-720.

7 — Bier, O. & M. Rocha e Silva — 1939 — Untersuchungen ueber Entzündung. I. *Virchow's Archiv* 303, 325-336.

8 — Chargaff, E. and K. B. Olson — 1937 — Studies on the chemistry of blood coagulation VI. Influence of protamine on the anti-coagulant effect in vivo. *Journ. of Biol. Chem.* 122, 153-167.

9 — Code, C. F. — 1937 — Hstamine-like activity of the white blood cells. *Journ. of Physiol.* 90, 485-500.

10 — Code, C. F. and H. R. Ing — 1937 — Isolation of histamine from white cell layer of centrifuged rabbit blood. *Journ. of Physiol.* 90, 501-510.

11 — Dale, H. H. — 1920 — Conditions which are conducive to production of shock by histamine. *Brit. Journ. of exp. Path.* 1, 103.

12 — Dale, H. H. — 1929 — Croonian Lectures. III. On some chemical factors in the control of circulation. *Lancet* 216, 1285-1290.

13 — Douglas, S. B. and L. Colebrook — 1916 — On the advantage of using a broth containing trypsin in making blood cultures. *Lancet* 2, 180-183.

14 — Dragstedt, C. A. (Comunicação pessoal).

15 — Dragstedt, C. A., Ramirez de Arellano, M., Lawton, A. H. and G. P. Youmans — 1940 — Passive sensitization of rabbit's blood. *Journ. of Immunol.* 39, 537-542.

16 — Dragstedt, C. A. and M. Rocha e Silva — 1941 — Effect of Trypsin upon blood histamine of rabbits. *Proc. of the Soc. f. exp. Biol. and Med.* 47, 420-422.

17 — Eagle, H. and T. N. Harris — 1937 — Studies on blood coagulation. V. The coagulation of blood by proteolytic enzymes. *Journ. of gen. Physiol.* 20. 543-560.

18 — Feldberg, W. 1941 — Histamine and anaphylaxis. *Ann. Rev. of Physiol.* 3, 671-694.

19 — Feldberg, W., Holden, H. F. and C. H. Kellaway — 1938 — The formation of lysocithin and of a muscle stimulating substance by snake venoms. *Journ. of Physiol.* 94, 232-248.

20 — Feldberg, W. and C. H. Kellaway — 1938 — Liberation of histamine by staphylococcal toxin and mercurio chloride. *Austr. Journ. of exp. Biol. and Med. Sc.* 16, 249-259.

21 — Feldberg, W. and C. H. Kellaway — 1938 — Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra-venom. *Journ. of Physiol.* 94, 187-226.

22 — Ferguson, J. H. — 1939 — Heparin and blood clotting. *Science*, 90, 272.

23 — Ferguson, J. H. — 1940 — The action of heparin, serum albumin and salmine on blood clotting mechanisms (in vitro). *Am. Journ. of Physiol.* 130, 759-770.

24 — FERGUSON, J. H. and B. N. ERICKSON — 1939 — The coagulant action of crystalline trypsin, cephalin and lung extracts. *Am. Journ. of Physiol.* **126**, 661-668.

25 — FERGUSON, J. H. and B. N. ERICKSON — 1939 — Calcium and cephalin in relation to the clotting power of crystalline trypsin. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* **40**, 625-626.

26 — GLAZCO, A. J. and J. H. FERGUSON — 1940 — Kinetics of thrombin inactivation as influenced by physiological conditions, trypsin and serum. *Journ. of gen. Physiol.* **24**, 169-188.

27 — HEARD, W. N. — 1917 — The Ca and P of the blood and a suggestion as to the nature of the act of coagulation. *Journ. of Physiol.* **51**, 294-317.

28 — HEUBNER, W. und H. BACHMANN — 1937 — Ueber die Freisetzung von Histamin durch Quecksilber. *Klin. Woch.* **16**, 279.

29 — HOLDEN, H. F. — 1940 —(Citado in KELLAWAY & TRETHEWIE).

30 — IZUMI, S., TANAKA, T. and T. TAKANO — 1937 — Studies of enzyme actions of pulmonal tissues. *Journ. of Orient. Med.* **27**, 131-132.

31 — JAQUES, L. B., CHARLES, A. F. and C. H. BEST, — 1938 — The administration of heparin. *Acta Med. Scandin.* Sup. **90**, 190-207.

32 — KATZ, G. — 1940 — Histamine release from blood cells in anaphylaxis in vitro. *Science* **91**, 221.

33 — KELLAWAY, C H. and E. R. TRETHEWIE — 1940 — Liberation of a slow reacting substance in anaphylaxis. *Quart. Journ. of exp. Physiol.* **30**, 121-145.

34 — KUNITZ, M. and J. H. NORTHROP — 1935 — Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin-inhibitor and an inhibitor-trypsin compound. *Journ. of gen. Physiol.* **19**, 991-1007.

35 — MELLAMBY, J. — 1935 — The supposed coagulation of oxalate plasma by trypsin. *Proc. of the Royal Soc.* B. **117**, 352-357.

36 — MINARD, D. — 1941 — The presence and distribution of histamine in blood. *Am. Journ. of Physiol.* **132**, 327-335.

37 — PFEIFFER, H. und A. JARISCH — 1913 — Zur Kenntnis der Eiweisszerfallstoxicosen. *Zeitsch. f. Immunitaetsf.* **16**, 38-91.

38 — RAMIREZ DE ARELLANO, M., LAWTON, A. H. and C. A. DRAGSTEDT — 1940 — Liberation of histamine by trypsin. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* **43**, 360-361.

39 — RAMSDELL, S. G. — 1928 — The use of the trypan blue to demonstrate the immediate skin reaction in rabbits and guinea pigs. *Journ. of Immunol.* **15**, 305-311.

40 — RIDEAL, E. K. and J. H. SCHULMAN — 1939 — Reactions whith monolayers and their biological analogies. *Nature.* **144**, 100-102.

41 — ROCHA E SILVA, M. — 1939 — Farmacologia da trypsina. Ação sobre musculo liso e coração isolado de mamifero. Efeitos circulatorios da tripsina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo **10**, 93-128.

42 — ROCHA E SILVA, M. — 1940 — Beitraege zur Pharmak. des Trypsins. I und II. *Arch. f. exp. Path. und. Pharmak.* **194**, 335-361.

43 — ROCHA E SILVA, M. — 1940 — Kallikrein and Histamine. *Nature.* **145**, 591.

44 — ROCHA E SILVA, M. — 1941 — Concerning the mechanism of anaphylactic and tryptic shock. *Journ. of Immunol.* **40**, 399-404.

45 — Rocha e Silva, M. & O. Bier — 1939 — Estudos sobre inflamação. IV. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo 9, 219-234.

46 — Rocha e Silva, M. and C. A. Dragstedt — 1941 — On the nature of the capillary permeability factor present in extracts of normal tissues. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* 46, 303-306.

47 — Rocha e Silva, M. and C. A. Dragstedt — 1941 — Liberation of heparin by trypsin. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* 48, 152-155.

48 — Rocha e Silva, M. and C. A. Dragstedt — 1941 — Observations on the trypan blue capillary permeability test in rabbits. *Journ. of Pharmac.*, Nov. 1941.

49 — Rose, B. and P. Weil — 1939 — Blood histamine in the rabbit during anaphylactic shock. *Proc. Soc. f. exp. Biol. and Med.* 42, 494-496.

50 — Schmitz, A. — 1937 — Ueber die Freilegung von aktivem Trypsin aus Blutplasma. *Ztsch. f. Physiol. Chem.* 250, 37-46.

51 — Trethewie, E. R. — 1938 — Experiments on problem of "free" and "bound" histamine and acetyl-choline. *Aust. Journ. of exp. Biol. and Med. Sc.* 16, 225-232.

52 — Vaughan, V. C. — 1913 —*Protein split products in relation to immunity and disease.* Lea & Farbiger. Philadelphia and N. York.

53 — Waldschmidt-Leitz, E. — 1928 — Zur Theorie der Blutgerinnung. *Naturwissenschaft.* 16, 1027.

54 — Waldschmidt-Leitz, E. und Mitarb. — 1929 — Ueber Blutgerinnung. *Zeitsch. f. physiol. Chem.* 183, 39-59.

55 — Waters, E. T., Markowitz, J. and L. B. Jaques — 1938 — Anaphylaxis in liverless dog, and observations on anticoagulant of anaphylactic shock. *Science* 87, 582-583.

—o—

Vol. 12 — Art. 14 Novembro de 1941

SOBRE AS "RATADAS" NO SUL DO BRASIL E O CICLO VEGETATIVO DAS TAQUARAS

POR

C. Pereira

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 41-44

Periodicamente as regiões agrícolas do sul do Brasil são perturbadas pelas devastações produzidas por certos ratos silvestres, os chamados "ratos de praga", cujas invasões constituem o que localmente recebe a denominação de "ratadas" ou "pragas de ratos".

Os habitantes da região sujeita a tal praga ligam o incremento do número de ratos à frutificação dos taquarais, fenômeno que obedece a um ciclo, sobre cuja existência não ha dúvida alguma, mas que não foi ainda corretamente determinado para cada espécie de taquara.

A investigação técnica do fenômeno não é facilmente realizavel, pois sua ocorrência dá-se em zonas onde não abundam técnicos que possam preocupar-se com ele, sendo as "ratadas" tão distantes umas das outras no tempo, que em geral assumem de cada vez o carater de novidade inevitavel e até certo ponto surpreendente. Nos intervalos entre as "ratadas", é possivel, no máximo, colher exemplares das dezenas de espécies de ratos silvestres, sem se poder advinhar realmente quais podem ser implicados no fenômeno; ao passo que, em relação às taquaras, pouco pode ser feito de aproveitavel, pois em cada lugar o leigo distingue logo uma meia dúzia de espécies, cujo aspecto pode variar nos detalhes em função do ambiente, espécies essas que só podem ser identificadas exatamente, através de suas flores, por um botânico competente no assunto.

Investigar bibliograficamente o problema tambem não é facil, pois nem sempre as taquaras teem sido identificadas, quando assinaladas em flor; por outro lado, verifica-se que nem todas as espécies de taquara teem, quando frutificam, a mesma repercussão nos ratos silvestres de uma zona e ainda, que nem em toda parte se observa praga de ratos como epifenômeno do encerramento do ciclo vegetativo dessas curiosas gramíneas.

DADOS BIBLIOGRÁFICOS SOBRE AS RATADAS

SAINT'HILAIRE (1851, pag. 443) relatando sua viagem pela então província de S. Paulo, diz o seguinte sobre o que observou em Itapeva: "On a vu, par ce qui précède, combien, à l'époque de mon

voyage, la disette était grande dans tout le "termo" d'Itapeva. Ce n'est pas de l'année de 1820 qu'elle datait; il y avait déjà deux ans qu'elle avait commencé. Em 1818 les bambous florirent, et il arriva ce qui, en pareil cas, a également lieu à Minas Geraes: de nuées de rats, attirés par les semences des bambous, dévorent une grande quantité de maïs, d'bord dans les plantations, et en suite dans les granges.

Quant à la récolte de 1819, elle avait été presque nulle, comme je l'ai déjà dit, à cause de l'excessive sécheresse; aussi le prix de la farine, qui est ordinairement de 480 reis "l'alqueire" (3 fr. les 40 litres), avait-il été poussé jusqu'à 4.000 réis (25 fr. les 40 litres), et moi-même je payai cette denrée 2.800 reis".

A próxima referência é dada por C. v. KOSERITZ (1876), e diz respeito ao ano de 1843, na colônia de S. Lourenço, no Rio Grande do Sul.

O fenômeno repetiu, segundo esse autor, para a mesma região, em 1876 e ainda no mesmo ano em Santa Catarina.

FRITZ MUELLER, 1881, por informação de tropeiros vindos do planalto, assinalou a ocorrência de ratada em Santa Catarina, no ano de 1877, entre a Serra e Curitibanos.

Segundo KOSERITZ (1876), os prejuizos acarretados aos colonos de S. Lourenço pela ratada de 1876 ascenderam a cerca de cem contos de réis (duzentos mil marcos), tendo sido devorados, só de milho, de 20 a 25.000 hectolitros. Os ratos teriam invadido as habitações, destruindo tudo que tivesse dureza menor que a de seus dentes, de tal modo que "nichts, auch gar nichts, was nicht gerade von Eisen, Stein oder Glas war, ist verschont geblieben".

A ratada de 1876 em S. Lourenço foi estudada por H. von IHERING, 1885, único autor que teve oportunidade de contribuir apreciavelmente com uma boa coleta de dados para o conhecimento do assunto.

Foi esse autor que reconheceu ser a ratada ocasionada por roedores da família Murídeos, tomando parte no fenômeno quatro ou cinco espécies diferentes, do antigo gênero *Hesperomys*, (*) principalmente *Oxymycterus rufus* DESMAREST e *Heligmodontia bimaculata* WATERHOUSE. GOELDI, 1893, admite como constando ocorrer nas ratadas, sem referir como o soube, mais *H. flavescens* (?) e *Akodon arenicola* WATERHOUSE, admitindo ainda a participação de mais duas ou três espécies não identificadas, do mesmo gênero.

Tal verificação foi importante, por permitir excluir do fenômeno os roedores da família Equimiídeos, constituida pelos "ratos de es-

(*) Os nomes dos mamíferos foram revistos pelo Snr. J. DA C. VIEIRA, do Departamento de Zoologia.

pinho", muitas vezes de proporções avantajadas, alguns dos quais habitam bambusais e taquarais, como o *Kannabateomys amblyonyx* WAGNER, por isso mesmo denominados "ratos dos bambús" ou "ratos das taquaras".

Assinalou ainda VON IHERING o fato de os ratos determinantes da praga procriarem de 5 a 8 filhotes em cada ninhada, sendo capazes de dar de 4 a 5 gerações por ano, números que muito contribuem para a compreensão da rapidez com que o fenômeno da ratada se torna agudo. Como inimigos mais comuns dos citados ratos aponta *Bothrops atrox* (L.), *Oncifelis geoffroyi* (d'ORB.) e *Pseudolopex gymnocercus* (FISCHER).

Si as aquisições foram interessantíssimas do ponto de vista zoológico, o aspecto botânico do problema continuou obscuro, pois não se ficou sabendo qual a espécie de taquara que é causa imediata do desencadeamento da ratada, sendo feitas referências apenas a "Bambusgrase, das Lichtrohr (Taquari oder Cresciuma)", nomes vulgares, que padecem de seus defeitos de origem.

DADOS BIBLIOGRÁFICOS SOBRE A FLORAÇÃO DAS TAQUARAS

Consideramos "taquaras" as gramíneas autoctones pertencentes às *Bambusaceae,* distinguindo-as dos "bambús" cultivados, alloctones.

Reconhecemos a pequena valia das ocorrências que vamos assinalar, devido à geral inexistência de determinações botânicas exatas. Entretanto, como são os únicos dados que nos foi possivel obter, poderão talvês servir ao menos como primeira tentativa de sistematização do assunto, por ora inteiramente obscuro.

A grande escassez de informes a respeito da floração das taquaras é devida, em parte, à falta de quem colha dados corretos, porem, muito mais, à discreção das próprias plantas que, constituindo muito tipicamente vegetação de sub-bosque, têm suas atividades mascaradas para a generalidade dos observadores, que não costumam penetrar nas formações mais densas de vegetação, o que ainda é agravado pela modéstia de tais flores, muito pouco aparentes.

As pequenas discrepâncias observadas na literatura a respeito do ano de floração das taquaras devem-se, em parte, à grande confusão que se costuma estabelecer na prática entre "floração" e "frutificação". Como as flores são muito pouco aparentes, confundem-se muito bem com as sementes, o chamado "arroz de taquara", que geralmente só são reconhecidas como tal quando caem ao chão; enquanto estão na espiga continuam sendo chamados "flor da taquara", para todos os efeitos.

FLORAÇÃO DE TAQUARAS

Nome	Localidade	Ano	Autor
Taquarussú	Serra do mar (Rio)	1816	Saint'Hilaire, 1830, trad. pg. 35
Taboca ou Tabioca	Alcaide Mor (Juiz de Fora)	1816	» » » » » 98
"Bambu" (taquara)	Itapeva (S. Paulo)	1818	» » 1851 (1.º vol., 443)
Lichtrohr	Taquara do Mundo Novo (R.G.S.)	1880-82	v. Ihering, 1885
Taquara	S. Lourenço (R. G. S.)	1843	C. v. Koseritz, 1876 (junho)
Lichtrohr	S. Lourenço (R. G. S.)	1863	H. v. Koseritz, 1885
Taquara	S. Catarina	1876	C v. Koseritz, 1876 (agosto)
Lichtrohr	S. Lourenço (R. G. S.)	1876	H. v. Ihering, 1885
Taquara	S. Catarina	1877	Fritz Mueller, 1881
Taquarussú	Ipiranga (S. Paulo)	1916	Luederwaldt, 1918
Taquara	Ipiranga (S. Paulo)	1916	» »
Taquarussú	Porto Mendes (Rio Paraná)	1917	Lutz, Souza Araujo e Fonseca Filho, 1918

Ora, a floração propriamente dita, quando ocorre, começa mais ou menos em outubro de um ano, surgindo os frutos nos primeiros meses do ano seguinte; quando maduros, estes começam a secar, desprendendo-se de suas inserções e indo ter ao chão.

Dando-se a florada no fim de um ano, só no ano seguinte o fenômeno começa a interessar aos roedores, podendo incrementar então o número dos ratos de praga.

Finalmente, os taquarais acamam seus colmos, secam e apodrecem, em tempo relativamente curto.

Portanto quando alguem afirma que um taquaral "floriu" em determinado ano, nem sempre se sabe si o informante está-se refe-

rindo ao aparecimento das flores, ou à queda das sementes, ou ainda à morte dos colmos da planta.

Outra causa da falta de concordância nas informações surge no fato de haver, na mesma zona ou local, uma decalagem de ao menos um ano na floração da mesma espécie de taquara, devido às condições peculiares do solo, principalmente, ao que parece, no que diz respeito à sua umidade.

Realmente, em taquarais da mesma espécie, separados por algumas centenas de metros apenas, um nas margens de um córrego, outro no espigão, o primeiro frequentemente antecede de um ano sua floração, de modo a já estar seco quando o segundo começa a florir.

NOVAS INFORMAÇÕES SOBRE FLORAÇÃO DAS TAQUARAS

Depois de percorrer parte do Estado do Paraná em fins de 1939, observando e colhendo informaçõês o mais possivel idôneas, pudemos obter mais as seguintes informações complementares sobre a floração de taquaras.

DADOS INÉDITOS SOBRE FLORAÇÃO DE TAQUARAS

Nome	Localidade	Ano	Fontes de informação
Taquara lixa *Merostachys fistulosa* DOELL.	Sul do Paraná e Jaguariaiva	1909	Numerosas informações verbais
Taquarussú	Mar de Espanha (M. G.)	1910 - 11	Informação de J. F. Zikán
Taquara lisa	Jaguariaiva (Pa.)	1914	Numerosas informações verbais
» »	» »	1927	» » »
» »	» »	1938	» » »
Taquara lixa *Merostachys fistulosa* DOELL.	» »	1938 - 39	Observação pessoal
Taquarussú	Itatiaia (S. P.)	1940 - 41	Informação epistolar de J. F. Zikán
Taquara lixa *Merostachys fistulosa* DOELL.	Ponta Grossa, Iratí (Pa.)	1939 - 40	Observação pessoal
Taquarí fino	Itatiba (S. P.)	1940	Informação de Francisco de Assis Sporques
Taquarí-assú	Itatiba (S. P.)	1940	Informação de Francisco de Assis Sporques

DIÁRIO DA VIAGEM AO PARANÁ

Reproduzimos o relatório que tivemos a oportunidade de apresentar à Secretaria da Agricultura e Diretoria do Instituto Biológico, sobre o que nos foi dado observar no Estado do Paraná, quando lá estivemos estudando a praga de ratos: "Atendendo ao ofício do Sr. Prefeito de Jaguariaiva, Dr. MARIO LOUREIRO, e telegrama do Dr. MARCOS AUGUSTO ENRIETTI, Diretor do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Agricultura do Estado do Paraná, e devidamente autorizado, embarcamos a 31 de outubro p. p. para Jaguariaiva, Estado do Paraná, tendo lá chegado às 8 horas do dia seguinte.

O motivo da viagem foi o estudo da "ratada", isto é a grande aglomeração de ratos silvestres, consequente à florada e frutificação dos taquarais, o que ocorre nas zonas meridionais do nosso país.

O ritmo extremamente lento da floração dos taquarais é o principal motivo de ter ficado até agora sem merecer um estudo detalhado, um acontecimento tão interessante, do ponto de vista biológico, e tão grave, economicamente.

1.º-XI-40

O Sr. Prefeito Municipal de Jaguariaiva, Dr. MARIO LOUREIRO, levou-nos de automovel a Cachoerinha, onde interrogamos alguns moradores, obtendo as primeiras informações interessantes sobre o assunto:

1.º) O taquarussú só ocorre em terras de bôa qualidade, nunca tendo sido visto com flôr.

2.º) A taquara lisa ou branca, floriu pela última vez em 1938. Como é exigente em matéria de qualidade de terras, só existe nas manchas de "terras fortes" e sua quantidade é insuficiente para determinar o fenômeno da ratada de maneira economicamente apreciavel.

3.º) A taquara lixa é a mais comum, dando-se bem nas "terras fracas". Existe em quantidade suficiente para, quando frutifica, poder determinar um aumento do número de ratos silvestres capás de assumir significação econômica.

4.º) Foi a taquara lixa que floriu em fins de 1939, derrubando as sementes em abril-maio de 1940, "acamando", secando e servindo como foco de atração e criação de ratos.

5.º) A última "ratada" assinalada na região foi em 1909, em consequência da frutificação da taquara lixa, tendo sido necessário defender os paiois com tricheiras, cujo corte era de perfil trapezoidal.

6.º) As últimas florações da taquara lisa foram assinaladas em 1914, 1927 e 1938, o que permite atribuir-lhe períodos respectivamente de 13 e 11 anos.

7.º) As últimas ratadas deram-se respectivamente em 1843, 1877, 1909 e 1940 em Jaguariaiva (a de 1941 dar-se-à no sul do Paraná, cuja florada ocorreu em 1940), havendo intervalos pois de 34, 32 e 31-32 anos para o ciclo vegetativo da taquara lixa.

2-XI-40

Passamos o dia na fazenda Tigrinho, onde o fenômeno foi sentido com maior intensidade. Aí foi possivel observar que a floração da taquara lixa não se dá com o sincronismo rigoroso das informações populares, pois um taquaral de lixa na baixada floriu em outubro-novembro de 39, derrubou o "arroz" em março de 40, estando agora (novembro) completamente seco. Depois de algumas horas de trabalho foi possivel encontrar no chão cerca de uma dezena de grãos completamente broqueados. Um taquaral do espigão, tambem de lixa, floriu em outubro de 40, começando a granar em novembro, o que permite prever a produção do "arroz" para março-abril do próximo ano.

Nesta localidade foi possivel colher material para a determinação botânica da taquara lixa, o qual foi encaminhando ao Departamento de Botânica do Estado, sendo determinado pelo Sr. J. F. DE TOLEDO como *Merostachys fistulosa* DOELL.

Muito interessante do ponto de vista zoológico, foi a obtenção de 7 exemplares do "rato mineiro", pequeno roedor silvestre, que o Sr. CARLOS DA CUNHA VIEIRA, do Departamento de Zoologia, teve a bondade de identificar como sendo o *Oryzomys longicaudatus* BENNET, o principal ator do fenômeno da ratada naquela localidade. Outra espécie apanhada no taquaral, foi *Rattus rattus* L., o rato cinzento, cosmopolita, que trocou os paióis pelo taquaral, em face da abundância de um alimento, segundo as evidências, mais do agrado dos roedores, pelo menos do ponto de vista quantitativo.

E' interessante assinalar o fato de *R. rattus* ter sido rechassado completamente do litoral pelo *M. norwegicus* ERXL., muito bem dotado para a luta pela vida; este tende a invadir cada vez mais o interior do país, havendo surgido no Brasil central por cerca de 1908, onde é denominado "rato rabo de couro", segundo NEIVA e PENNA, 1916.

O achado de *Rattus rattus* juntamente com ratos silvestres, nos taquarais, parece indicar sua tendência para associar-se e eventualmente substituir os murídeos autoctones, que tambem não conseguem acercar-se suficientemente do homem, devido à concorrência de *Mus norwegicus*.

Na mesma fazenda, 4 gatos domésticos abandonaram as comodidades da vida caseira, dirigindo-se para os taquarais, onde havia abundância de aves granívoras e de ratinhos não agressivos.

A respeito dos hábitos do "rato mineiro", é admitido localmente que ele é tímido, não agride e não grita. Parece-nos possivel confirmar tais afirmações, pois o rato cosmopolita matou 4 dos 7 ratos mineiros no decorrer da noite, durante a qual dormimos pouco devido à abundância de mosquitos; cada tragédia era anunciada apenas pelo reboliço na caixa, sem que se ouvisse o menor som emitido pelas vítimas.

Falava-se tambem num "rato pitoco", do mesmo porte que o "rato mineiro", e que tambem não gritaria, diferenciando-se dele facilmente por ter a cauda curta. Teria sido o rato mais molesto da ratada de 1909, porem menos importante em 1940. Deste, não nos foi possivel apanhar nenhum exemplar.

ESTRAGOS PRODUZIDOS

Tanto o "rato mineiro" como o "rato pitoco" devastam as roças de milho recemplantadas, fazendo escavações obliquas, que os levam até os grãos semeados, afim de os comer.

Normalmente, o prejuizo causado pelos ratos silvestres pode ser considerado como desprezivel. Como a frutificação dos taquarais atrai os roedores da redondeza, proporcionando-lhes abrigo e comida abundante, seu número aumenta progressivamente, até o momento em que o esgotamento do estoque de "arroz de taquara" acarreta uma séria crise alimentar. Os roedores são levados a principio a atacar as roças recemplantadas nas proximidades dos taquarais. Na fazenda Tigrinho isso obrigou a replantar-se quatro vezes o milho. A seguir, invadem os paióis e outras construções, principalmente ao anoitecer, retirando-se novamente para o mato, ao clarear do dia. São muito habeis em andar no alto das cercas e construções em geral, obrigando os cães a saltar para atacá-los.

Não havendo instalações humanas pelas proximidades, migram em massa em busca de alimentos, indo morrer frequentemente à beira dos rios, onde param para dessendentar, encontrando a morte, primordialmente pela fome, possivelmente acelerada por alguma epizootia,

desencadeada à custa da miséria orgânica consequente à sub-alimentação e esgotamento físico devido às caminhadas.

Como documento do valor alimentar do "arroz de taquara" cita-se o melhor desenvolvimento das porcadas criadas no tempo da frutificação dos taquarais.

VERSÕES POPULARES SOBRE A ORIGEM DOS RATOS DA TAQUARA

Tivemos oportunidade de colher as seguintes "teorias" populares sobre a origem da ratada, todas baseadas na "geração espontânea" dos ratos "mineiro" e "pitoco":

1.º) Os ratos "geram" do "bicho da taquara" (larvas e crisálidas da *Myelobia smerintha* HUEBNER, que se criam nos entre-nós, a mariposa amarela e gorducha que, ainda este ano, tanto deu que fazer aos serviços de limpeza pública das grandes cidades de bôa parte do sul do País).

Os "argumentos" a favor desta origem dos ratos são:

a) entre o bicho da taquara (= lagartas) e os ratos, aparecem formas intermediárias, mais escuras, nas quais se notariam, com alguma bôa vontade, os primórdios da morfologia externa dos ratos (= crisálidas);

b) encontram-se ratos, nos quais as patas anteriores estariam apenas aparecendo (nos indivíduos mortos do "rato mineiro", as patas anteriores ficam muito retraidas);

c) os ratos da taquara não teriam costelas (sua ossificação não é muito intensa);

d) os ratos da taquara não gritam (o que parece verdade).

Ao se objetar como poderiam os ratos sair da taquara, devido ao tamanho que teem, foi explicado que eles furam os nós, estabelecendo um canal contínuo que, segundo uns, iria ter ao ápice do colmo, ao passo que a maioria das pessôas acreditava dirigir-se para as raizes, conduzindo os roedores para o meio exterior. Apesar das tentativas numerosas, não puderam demonstrar-nos a existência dessas galerias contínuas o que, se abalou a convicção de alguns, não impediu que muitos outros continuassem fieis às suas idéias, baseando-se em que talvez a época não fosse propícia para tal demonstração; certas pessôas concordaram na futilidade de se insistir em procurar muito de perto todos os elos de uma cadeia de fatos, a respeito dos quais não parecia haver a menor vantagem em ter dúvidas.

2.º) Os ratos "geram" das pontas das taquaras.

3.º) Os ratos "geram" da raiz das taquaras.

As segunda e terceira maneiras de interpretar a ratada são menos bem urdidas, parecendo estar antes relacionadas como formas condensadas da primeira.

3-XI-40

A manhã foi ocupada com a necrópsia dos ratos obtidos na véspera, colheita dos ecto e endoparasitos, acondicionamento do material, rotulagem, ordenação das notas, etc..

Foi feita tambem uma visita ao frigorífico Matarazzo, no qual são abatidos cerca de 120.000 porcos por ano e onde pudemos apreciar o correto serviço de inspeção de carne e as parasitoses mais frequentes.

À tarde fomos ao Posto Zooténico, onde tivemos a oportunidade de colher material da formiga cortadeira "quem-quem-mineira", *Acromyrmex* sp., muito frequente na região, que foi entregue ao Sr. MARIO AUTUORI, do Instituto Biológico.

Esta formiga é a espécie cortadeira que mais prejuizos causa na região, onde não encontramos as saúvas verdadeiras, que dizem ser muito abundantes no municipio de Sengés. A única explicação que nos pareceu aceitavel para tal fato, foi a pequena espessura da terra aravel nos campos do Paraná, que muitas vezes teem apenas cerca de 30 cmts., quando as saúvas costumam instalar suas panelas frequentemente a mais de um metro de profundidade.

Ás 18 horas chegou de Curitiba o Dr. MARCOS AUGUSTO ENRIETTI, Diretor do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Agricultura do Estado, em um auto oficial gentilmente cedido pelo Governo Paranaense, convidando-nos para percorrer diversas zonas do Estado, afim de podermos formar um juizo mais exato do problema.

Nessa mesma noite concertamos o itinerário a percorrer, dispondo-nos a partir no dia seguinte.

4-XI-40

Partimos logo de manhã, em companhia dos Drs. MARCOS A. ENRIETTI, MARIO LOUREIRO e HELIO PIMENTEL, este último, agrônomo dos campos de cooperação do Ministério da Agricultura, rumo a Cachoerinha, São José, Wenceslau Braz, Barbosas e Siqueira Campos, onde almoçamos.

Nesta cidade foi muito interessante a palestra que mantivemos com o Sr. JOSÉ ZGODA, antigo morador em Nova Guaraní, no sul do Estado, que referiu a florada da taquara lixa havida naquela região em outubro de 1909, cujas sementes cairam em abril de 1910, determinando uma ratada muito intensa, na qual predominou o "rato pi-

toco", havendo tambem o "rato mineiro" e um rato maior, cinzento-azulado, provavelmente o *Rattus rattus* já apanhado em Jaguariaiva.

Confirmou os detalhes que já sabiamos sobre a questão, acrescentando que, à noite, o barulho dos ratos no taquaral era semelhante ao da chuva.

Voltamos por Barbosas e Cachoerinha, onde ficaram os Drs. LOUREIRO e PIMENTEL, seguindo nós para Piraí, onde jantamos, para em seguida alcançarmos Castro, onde pernoitamos.

5-XI-40

De manhã seguimos para Ponta Grossa. Em caminho, tivemos a oportunidade de verificar exatamente como eram os campos do sul, do ponto de vista da incidência do berne.

Do sul do País tinham chegado queixas de que este ano fora particularmente desastroso, no que diz respeito à infestação do gado por esses ectoparasitos. Em zonas onde o berne não tinha normalmente importância prática, houve grande depreciação dos couros por essa causa.

Atendendo às consultas, faziamos ver a dependência em que o berne se mantem, relativamente ao sombreamento pela vegetação mais cerrada, insistindo no fato de tal invasão por berne dever estar ligada a reflorestamentos da região ou outra modificação equivalente do meio; entretanto, negava-se a existência de reflorestamento ou de matas naturais nas proximidades das pastagens.

O contacto com os campos do sul veiu ensinar-nos, porem, que as coxilhas são geralmente separadas umas das outras por vegetação cerrada, que localmente não são conhecidas por "matas" e sim como "capões", sendo perfeitamente capazes de abrigar as formas aladas da *Dermatobia hominis* (L. JOR., 1781).

Ora, com a seca excepcional deste ano, o gado viu-se naturalmente obrigado a entrar em contacto mais íntimo com os capões, oferecendo assim maiores possibilidades de desenvolvimento para a mosca do berne.

Depois de um lanche em Ponta Grossa, rumamos para Itaiacoca, onde os taquarais estavam florindo.

Conseguimos colher pela primeira vez material do crustáceo anomura *Aeglea loevis* (LATR.), localmente denominado "maçaneta", infestado com temnocefalídeos, grupo cujo estudo está sendo feito ha algum tempo em nosso laboratório.

À tarde visitamos Vila Velha, de onde trouxemos um Coccídeo, que foi entregue ao nosso colega Dr. H. S. LEPAGE.

A noite examinamos as "maçanetas", fixamos os Temnocéfalos e acondicionamos o material colhido.

6-XI-40

De manhã o automovel precisou sofrer alguns reparos, depois do que seguimos para Imbituva e Prudentopolis; aqui, pudemos observar novamente taquarais já secos, não muito distantes de outros que só então estavam florindo.

Ainda não longe de Ponta Grossa, encontramos um taquaral, cuja florada apresentava-se totalmente comprometida por uma broca, da qual colhemos material; isso permite prever o não aparecimento de ratada no próximo ano, apesar da florada dos taquarais.

Finalmente, fomos pernoitar em Iratí.

7-XI-40

Em Iratí, visitamos pela manhã o "campo do governo", em cujas proximidades os taquarais tinham acabado de florescer, havendo um ataque discreto pela broca assinalada perto de Ponta Grossa. (*)

Foi possivel verificar nesse local dois fatos interessantes a respeito da taquara lixa:

1.º) a existência de duas formas ecológicas distintas, uma comum, desenvolvida à sombra, bem provida de folhas, e outra não protegida do sol, cuja frutificação é sessil e desprovida de folhas, de modo a simular um "cordão de frade".

2.º) num taquaral cortado e recentemente brotado, colmos de pouco mais de um palmo tinham florescido simultaneamente com os plenamente desenvolvidos, o que nos mostra dever o motivo da floração ser procurado não nos colmos, porem no rizoma da taquara.

Foi visto um "rato pitoco", do mesmo porte que o "mineiro", não podendo entretanto ser capturado.

Na estação experimental havia plantação de batatinhas, trigo e milho, estas últimas em terra de derrubada recente. Na ocasião, a batatinha sofria estragos determinados pelo "coró", (=lagarta de rosca), da qual trouxe material para a Secção de Entomologia do Instituto.

(*) Tivemos o prazer de ver nossas previsões confirmadas pela informação verbal do Dr. MARCOS ENRIETTI, em 14-VII-941, de que na zona de Ponta Grossa não houve realmente ratada, ao passo que, de Iratí, recebeu ele oferta para compra de 3.000 kgs. de "arroz de taquara".

O terreno da derrubada estava incrivelmente infestado com numerosos ninhos da "quem-quem-de-cisco" *Acromyrmex* sp., da qual trouxe material para o Sr. M. AUTUORI, sendo os ninhos feitos ou superficialmente, no chão, ou nos tocos existentes no terreno. A "quem-quem-mineira" não havia ainda invadido esses terrenos de derrubada recente.

Em nossa excursão fomos acompanhados pelo Sr. Prefeito Municipal, Tte. AMARAL, que foi muito gentil.

Depois do almoço rumamos para Curitiba, via Palmeira, embora fosse nossa intenção atingir a zona limítrofe com Santa Catarina, onde o fenômeno é mais acentuado que no Paraná; interrompemos a viagem por não podermos no momento permanecer por tanto tempo ausente.

Chegamos a Curitiba ao anoitecer.

DETERMINISMO DAS RATADAS

De todos os elementos que temos, de informação, verifica-se que as ratadas de que se teem notícia no sul do país são as seguintes: 1818 (sul de S. Paulo), 1843, 1876-7, 1909-10 e 1939-40 (do Paraná ao norte do Rio Grande do Sul). Os intervalos entre as ocorrências foram, respectivamente de 25, 33, 33 e 30 anos. A ratada de 1818 não foi assinalada na zona típica do fenômeno, não se sabendo ao certo qual a espécie de taquara que a teria fomentado. Das três últimas ocorrências, só para a de 1939-40 foi possivel identificar a taquara responsavel, que é a "taquara lixa", *Merostachys fistulosa* DOELL. Entretanto, como a única taquara quantitativamente representada no sul de modo a poder sustentar uma séria praga de ratos, é justamente a taquara-lixa, julgamos não errar admitindo que tenha sido tambem essa a causadora das ratadas de 1843, 1876-7 e a de 1909-10.

Outra espécie de taquara, que ocupa o segundo lugar quantitativamente nos estados do sul, é a "taquara lisa", *Merostachys* sp.. Temos dados sobre sua floração nos anos de 1863, 1876 e 1883, com intervalos respectivamente de 13 e de 7 anos, seguindo-se uma lacuna de 31 anos sobre os quais não ha informações, para recomeçarem os dados quanto aos anos de 1914, 1927 e 1938, isto é, com intervalos respectivamente de 11 e 13 anos; isso permite supor que entre 1883 e 1914 devam ter ocorrido 3 florações da taquara lisa, sobre as quais não conseguimos informes.

A respeito das outras espécies de taquara os dados são tão fragmentários que não permitem ideia alguma quanto á duração de seu ciclo vegetativo. A única noção que se pode ter é a de que tais ciclos

são relativamente curtos, isto é, mais ou menos da ordem de grandeza do da taquara lisa.

As médias de duração do ciclo para a taquara lixa, de 30,25 anos (incluindo a de 1818, que é duvidosa) ou de 32 anos (com exclusão da de 1818) e para a taquara lisa, de 11 anos, foram obtidas com tão pequeno número de dados, que só por acaso poderão representar o legítimo valor das médias reais. Entretanto, constituem todo o material disponivel.

Dadas a transitoriedade e o largo intervalo que separa cada ratada, parece-nos que o único processo econômico de se fazer a profilaxia de tal calamidade seria a destruição preventiva das formações de taquara lixa nas proximidades das explorações agrícolas, sempre que esta espécie de taquara começar a florir, pois desse modo seria possivel evitar a superabundância de alimento, que atrai e sustenta os ratos durante vários meses do ano seguinte.

A ratada é um fenômeno eminentemente sulino em nosso país, pois nos estados centrais e do norte as frutificações das taquaras são acompanhadas mais por grandes aglomerações de aves granívoras, que propriamente de ratos, cujo incremento nunca atinge às proporções de verdadeira calamidade, embora chegue às vezes a aborrecer sensivelmente os moradores das suas proximidades.

A justificação de tal fato parece-nos dever residir na alta produtividade da taquara lixa, que dá sementes ao longo de todos os colmos e encontra condições mais adequadas para o seu desenvolvimento no sul do país. "A área de dispersão de *Merostachys fistulosa* DOELL, atinge tambem mais o norte, e o tipo da espécie é procedente de Caldas, em Minas Gerais", segundo comunicação epistolar do Snr. J. F. DE TOLEDO, Chefe de Serviço Científico do Departamento de Botânica do Estado, em 2-12-40.

Mesmo no sul, a taquara lixa cede frequentemente lugar, nas chamadas "manchas de terra forte", à taquara lisa, espécie que não determina pragas de ratos, evidentes, e sim pequenas aglomerações deles, sem maior significação econômica, por produzir muito menos "arroz de taquara", como informam os moradores da zona.

Portanto, nos limites de sua área de dispersão, a taquara lixa tenderá cada vez mais a ser substituida ou entremeiada por outras espécies menos produtivas, devendo-se ainda salientar o fato de as matas, do Norte do Paraná e de S. Paulo para o norte irem adquirindo um carater tropical cada vez mais acentuado, portanto menos propício ao domínio exclusivo do espaço por número restricto de espécies abundantemente representadas, dando margem à multiplicação de tipos di-

ferentes, que coexistem mais equilibradamente, conduzindo à quebra da monotonia biológica, responsavel pelo carater de "praga" que assumem certos animais, nas zonas de clima mais temperado.

A guisa de confirmação de tal fato, julgamos interessante confrontar os nomes vulgares por nós colhidos no Paraná, com os obtidos em S. Paulo. A respeito destes últimos, peço licença para aproveitar uma lista obtida pelo Snr. ELISÁRIO MARTINS DE MELLO, Professor de Geografia da Escola Normal de Itapetininga, no Estado de S. Paulo, compreendendo os tipos de taquara por ele observados na zona situada entre a Serra de Paranapiacaba e aquela cidade. Sempre que se tratar de nome de origem tupí, juntamos sua provavel significação portuguesa.

NOMES DO PLANALTO PARANAENSE

"Taquara lixa", *Merostachys fistulosa* DOELL.: a mais difundida no Estado, relativamente alta, internódios grandes, cutícula áspera, verde-escura, tida como característica das "terras fracas"; é a responsavel pelas ratadas.

"Taquara lisa" ou "taquara branca", *Merostachys* sp.: do mesmo porte que a anterior, internódios médios, cutícula lisa, cor clara, tida como característica das "terras fortes".

"Taquarussú" (taquara grande), *Chusquea* sp.: de grande porte, com espinhos, encontrada nas matas densas, em terras boas, principalmente no norte do Estado.

"Taquarova" (taquara brotada), *Olira* sp.: tipo anão, que não vi atingir mais de um metro de altura. Em alguns lugares dão tal denominação aos primeiros colmos que brotam ao reiniciar-se o período vegetativo de qualquer espécie de taquara.

"Crissiuma", *Guadua* sp.: colmos finos e maciços.

"Taquarí" (taquara pequena), *Arundinária* sp.: fina, formando emaranhados.

NOMES DO SUL PAULISTA
(segundo o Snr. E. M. DE MELLO)

"Taquara branca", *Merostachys* sp.: macia, esbranquiçada, gomos longos; a preferida para as obras de taquara; já está quasi desaparecida em Itapetininga; cresce em terra boa.

"Taquara mirim" (taquara pequena), *Merostachys* sp.: áspera, gomos compridos e de grossura média; está sendo empregada em substituição à taquara branca; cresce em terras regulares e boas; é crença popular que não floresce, pois dizem que existe sempre.

"Taquara poca" (taquara que estoura), *Merostachys* sp.: semelhante à mirim, porem mais dura e de gomos mais grossos; não é exigente em relação à qualidade da terra, sendo muito comum.

"Taquara pinima" (taquara pintalgada), *Merostachys* sp.: muito áspera e de gomos compridos (mais de metro), fina, com cerca de um centímetro de diâmetro máximo; muito apreciada para os trabalhos comuns de taquara; cresce em terras boas.

"Taquarussú" (taquara grande), *Chusquea* sp.: gomos compridos e fortes; tem espinhos, não sendo usada para obras; cresce muito e deita, entrecruzando-se em todas as direções, sendo muito comum nas matas do sertão de Paranapiacaba.

"Taquara uvú" (taquara mole), *Merostachys neesi* RUPR.: de aspecto semelhante ao do taquarussú, com gomos lisos e compridos; muito apreciada para obras mais finas pelos sertanejos; prefere as terras boas.

"Taquara jatevoca" * (taquara de espinhos ou taquara cortadeira), *Chuquea* sp.: semelhante ao taquarussú, com espinhos, muito dura, preferindo a beira dágua; é usada para jacás e esteiras de carro; seu segundo nome vulgar é devido ao apresentar aresta afiadíssima depois de cortada.

"Taquarantan" (taquara dura), *Merostachys* sp.: parecida com o taquarussú, áspera, de gomos longos; é usada para jacás e esteiras de carro.

"Taquara quicé" (taquara que corta), *Merostachys* sp.: muito áspera, de gomos longos e finos; é empregada em balaios e peneiras, sendo muito usada como "canudo de pito" (quicé).

"Taquarí" (taquara pequena), *Arundinaria* sp.: é muito fina, não se prestando para obras; é acusada de ser venenosa, provocando dores de barriga em cavalos; sobe pelos arbustos como trepadeira.

"Crissiuma" ou "Cressiuma", *Guadua* sp.: fina e de gomos enegrecidos quando em terra boa; nas terras regulares e ruins torna-se mais grossa; tem os gomos maciços; é muito usada para suspender o ventre dos cavalos de corrida, dizendo os caboclos: "a crissiuma aluviana os alimar".

"Lambe papo", (?): fina e muito áspera, é o tormento dos cavaleiros nas estradas estreitas e más; deixa "assada" a região do corpo por onde roça; como frequentemente atinge o pescoço, daí o seu nome.

"Corda de viola", (?): finíssima e rasteira; sem aplicação alguma.

(*) Provavelmente, a mesma que H. Florence registou com o nome "guaitivoca", no rio Coxim (pág. 52).

Outra taquara que merece menção é a "taboca" (vara oca), *(Guadua* sp.?) existente por exemplo na zona de Barretos (S. Paulo), de pequeno porte, com espinhos, trançando muito seus colmos de modo a dificultar grandemente os trabalhos de pastoreio a cavalo. A "taboca" ou "tabioca" *(Chusquea* sp.?) vista em flor na Serra do Mar por SAINT'HILAIRE é de porte grande, provavelmente nada tendo de comum com a de Barretos.

Os nomes vulgares acima assinalados nada nos ensinam quanto à botânica das taquaras, excepto quando foi possivel sua correta identificação científica; as poucas palavras que acompanham cada tipo referido dessas gramíneas autoctones não teem fins descritivos, servindo apenas para chamar a atenção não só para o emprego habitual que lhes dão os nossos caipiras, na confecção de seus utensílios de uso doméstico ou rural, como tambem o "habitat", quando este é mais particular.

O largo emprego das taquaras nas indústrias caseiras, hábito herdado dos selvícolas, é a causa da terminologia popular das taquaras, sempre de origem tupí quando elas são uteis ou pelo menos notaveis por qualquer circunstância, só se encontrando nomes realmente portugueses ("lambe papo" e "corda de viola") quando elas começarem a se notabilizar a partir das atividades dos colonos, ou então nas zonas onde a influência das linguas européias sobrepujou largamente a das línguas autoctones, como no sul do País (taquaras "lixa", "branca", "lisa", etc.).

É interessante assinalar o fato de, em Imbú-Guassú, a poucas dezenas de quilómetros da Capital de S. Paulo, onde um isolamento cultural manteve a primitiva influência tupí no linguajar local, termos anotado a expressão "taquara mambú", para designar o "bambú comum", *Bambusa pallescens* (DOELL.) HACK., única espécie aloctone da família que lá penetrou, sendo muito usada para cercar os quintais adjacentes às casas de moradia, tendo seu nome vulgar devidamente abrasileirado, dentro da mesma linha de designação das verdadeiras taquaras. Por sua imediata utilidade nas atividades dos caboclos, as taquaras constituem uma excelente exceção no meio da proverbial pobreza de nomes vulgares das plantas em nosso meio.

A diferença de produtividade atrás assinalada entre a taquara lixa e outras espécies indígenas, é reforçada pelo relato de SAINT' HILAIRE, acerca do que ele observou no "taquarussú", em 1816, ao subir a Serra do Mar, ainda à vista do Corcovado e da Tijuca:

"descendo a montanha tive o prazer de encontrar em floração, no começo de dezembro, grande número de *taquarussús,* a maior es-

pécie de bambú (*) que cresce no Brasil. Estas gramíneas gigantescas podem elevar-se a 50 ou 60 pés de altura; suas varas, de um verde escuro, têm a grossura de um braço; quasi desde a base encurvam-se em arco e frequentemente sua extremidade toca o chão. Nos nós, que são afastados uns dos outros de vários pés, nascem verticilos de ramos curtos e carregados de folhas lanceoladas. Passam-se vários anos desde o nascimento do taquarussú até a época de floração, que põe termo à sua existência. Imensos panículos de 15 a 20 pés de comprimento se desenvolvem na extremidade do caule. Mas a esse tempo a planta já perdeu toda beleza; não lhe restam mais quasi folhas; o matiz pardacento destas parece anunciar-lhe a próxima destruição, e a rigidez dos ramos afastados do panículo acaba por lhes tirar toda elegância.

POSSIVEL NEXO CAUSAL DOS CICLOS DAS TAQUARAS

Verificamos que o ciclo provavel da taquara-lixa é de trinta e poucos anos (cerca de 32), e que o da taquara lisa é de cerca de 11 anos. Quanto ás outras espécies, não foi possivel obter sequências de dados suficientes para se estabelecer qualquer juizo a respeito da duração de seus ciclos.

Ora, ha um fenômeno astronômico, as manchas solares, cujas variações vão refletir amplamente na meteorologia terrena, principalmente através de perturbações magnéticas, barométricas, térmicas e pluviométricas, com intensidade variavel nas diferentes zonas, de modo a poderem repercutir muito ativamente nas condições biológicas da terra.

A anotação rigorosa do número de manchas solares visiveis em cada ano, a partir de 1749, demonstrou estar tal fenômeno muito longe de ser constante, alternando-se com apreciavel regularidade anos de números máximos de manchas, até com 154,4 em 1778, com anos de números mínimos delas, zero em 1816, de tal modo a repetir-se a sucessão de números de manchas dentro de ciclos, cujos valores oscilam ao redor de 11,2 anos, com mínimo de 7 em 1830-37 e máximo de 17 em 1787-1804.

Por outro lado, alem do ciclo simples de manchas solares, verifica-se a existência de agrupamentos de ciclos mais ou menos intensos. de modo a se obterem múltiplos dos ciclos habituais, ou seja, verdadeiros ciclos de ordem superior.

Alem disso, cada ciclo de manchas costuma ser acentuadamente assimétrico, sendo sua fase ascendente alguns anos mais curta que a descendente. No oeste norteamericano a temperatura média é ligeira-

(*) "Bambú", para o autor, corresponde ao que denominamos "taquara".

mente mais elevada nos mínimos do que nos máximos de manchas. Uma consequência interessante dessa heterogeneidade dentro do ciclo básico de manchas, é a possibilidade da existência de ciclos biológicos submúltiplos, ou seja ciclos menores, de 5-6 anos, em relação ao básico, que é de 10-12 anos.

Como exemplos de ciclos biológicos concordantes com o ciclo das manchas solares, podemos citar as seguintes verificações: de PHELPS e BELDING (1931) sobre os resultados da pesca do salmão pelos sócios do Restingouche Club e os de A. G. HUNTSMAN sobre sua pesca comercial em Nova Brunswick (Canadá); de ELTON (1931) sobre o número de peles de vários animais obtidas pela Hudson's Bay Company; de HUNTINGTON (1931) sobre o crescimento das sequoias; de WEGELIN (1931) sobre o crescimento de árvores em Hanover; de COMSIA (1931) sobre os surtos de eimeriose dos coelhos na Rumânia, e de RAO (1938), na Índia, e de TRELLES (1940), na Argentina, sobre a extenção das pragas de gafanhotos.

São interessantes as observações de HUNTINGTON (1921), sobre o fato de os E. E. U. U. terem passado, desde 1837 até 1930, por cinco ciclos de secas e de baixa produtividade agrícola, que se apresentaram cada 18,6 anos em média; dentro de tal período de tempo deram-se 6 pânicos na bolsa, cujos intervalos tambem foram de 18,4 anos em média.

A respeito de ciclos biológicos triplos dos ciclos de manchas solares, temos as observações de EIDMAN, (1931), sobre os insetos das florestas na Alemanha, e de ROWAN, (1931), sobre o número de várias aves, e o nivel da água do lago Alberta, dentro portanto do clássico ciclo de BRUECKNER (1891), reconhecido sem ter sido levada em consideração a existência dos ciclos de manchas solares.

Não é necessário grande esforço de imaginação para verificar que a "taquara lisa", *Merostachys* sp., tem um ciclo vegetativo da mesma ordem de grandeza (cerca de 11 anos) do ciclo de manchas solares e que a "taquara lixa", *Merostachys fistulosa* DOELL., tem seu ciclo (cerca de 32 anos) equivalente ao triplo do ciclo de manchas solares, concordando portanto com o ciclo clássico de BRUECKNER.

Examinando-se um gráfico das manchas solares, notam-se que as florações da "taquara lixa" incidem cerca de 2 a 3 anos antes do mínimo de cada terceiro ciclo de manchas solares.

Quanto à "taquara lisa", as ocorrências de sua floração tendem a coincidir com o início do período ascendente do ciclo das manchas; entretanto, a concordância não é tão correta como para a "taquara lixa", devido provavelmente a ser mais curto seu período vegetativo,

que assim ficará mais sujeito às anormalidades meteorológicas de carater local, capazes de fazerem variar, dentro de certos limites, a extenção do seu ciclo.

Esperamos que, com o conhecimento de novos dados, seja possivel esclarecer em definitivo as relações causais entre o ciclo das manchas solares e ciclo vegetativo das taquaras brasileiras, para cujo esclarecimento o presente trabalho representa apenas uma primeira aproximação; o assunto, alem do grande interesse científico que apresenta, é de molde a assumir importância econômica nas regiões do sul do País.

ON THE RAT-PLAGUES IN SOUTHERN BRAZIL AND THE VEGETATIVE CYCLE OF "TAQUARAS"

Abstract

This paper deals with a study of the "ratada" or "praga de ratos" (rat-plague) that occurred in 1939-40 in the state of Paraná, Southern Brazil.

The species of Bambusaceae whose fructification originated the phaenomenon was the "taquara-lixa", Merostachys fistulosa DOELL.

The predominating native rat was Oryzomys longicaudatus BENNET. *Rattus rattus L. was also found associated with the wild rats at the "taquaral" (community of native Bambusaceae).*

About thirty two years is the period between the "ratadas", which depend upon the vegetative cycle of "taquara-lixa", Merostachys fistulosa DOELL., *that is, the triple of the sunspot cycle, or approximately correspondent to the Brueckner's cycle.*

For another species, "taquara-lisa", Merostachys sp., not responsible for "ratadas", the vegetative cycle was found to require about eleven years, in close agreement with the sunspot cycle.

Some incidental biological observations, especially in connexion with fungus-growing ants, were made during the trip for the study of the problem.

BIBLIOGRAFIA

BRUECKNER — 1891 — *Klimaschwankungen seit 1700.* Viena.

CLEMENTS, F. E. e SHELFORD, V. E. — 1939 — *"Bio-Ecology".* John Wiley & Sons, Inc. Nova York. 425 p.p.

COMSIA — 1931 — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

ELTON, C. — 1931 — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

EIDMAN, H. S. — 1931 — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

FLORENCE, H. — 1941 — Viagem fluvial do Tietê ao Amazonas (de 1825 a 1829). Tradução do Visconde de Taunay. Cia. Melhoramentos de S. Paulo.

GOELDI, E. — 1893 — *"Os mamiferos do Brasil"*. Alves & Cia. Rio.

HUNTINGTON, E. — 1931 — "The Matamek Conference on biological cycles". *"Science"*, 74, 229-235.

IHERING, H. v. — 1885 — "Zur Kenntnis der brasilianischen Mäuse und Mäuseplagen". *Kosmos*, 9 (2), 423-437. Stuttgart.

KOSERITZ, C. v. — 1876 — Deutsche Zeitung (junho) *in* IHERING, 1885.

KOSERITZ, C. v. — 1876 — *Ibidem*, (2 de agosto) *in* IHERING, 1885.

LUEDERWALDT, L. — 1918 — "O Herbário e o Horto Botânico do Museu Paulista". *Rev. Mus. Paul.*, 10, (287-311). S. Paulo.

LUTZ, A., ARAUJO, H. C. DE S. e FONSECA FILHO, O. DA — 1918 — "Viagem científica no Rio Paraná e a Assuncion com volta por Buenos Ayres, Montevidéo e Rio Grande", *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 10 (2), 104.

MUELLER, FRITZ — 1882 — "Bemerkungen, zu: HILDEBRAND, die Lebensdauer und Vegetationsweise der Pflanzen, ihre Ursachen und ihre Entwicklung". *Engler's Botanisches Jahrbuch*, 2, 391-394.

NEIVA, A. e PENNA, B. — 1916 — Viagem científica pelo norte da Baía, sudoeste de Pernambuco, sul do Piauí e de norte a sul de Goiás. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 8 (3), 74-224.

PHELPS, E. B. e BELDING, D. L. — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

RAO, W. — 1931 — C. R. 5.éme Conferénce Intern. Recherches Antiacridiènes. 252-257. Bruxelas.

ROWAN, W — 1938 — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

SAINT-HILAIRE, M. A. — 1830 — Voyages dans l'interieur du Brésil. 1.re partie Voyages dans les Provinces de Rio de Janeiro et Minas Geraes. Grilimbert et Dorez. Paris. 1.º vol. (Trad. de C. R. Lessa, 1938, Cia. Edit. Nac. S. Paulo).

SAINT-HILAIRE, M. A. — 1851 — Voyage dans les Povinces de Saint Paul et de Sainte-Catherine. 1.º vol. A. Bertrand. Paris.

TRELLES, C. A. L. Y — "La lucha moderna contra la langosta en el país". *Ac. Nac. de Agr. y Veter.*, 5, 1-31. Buenos Aires.

WEGELIN, H. M. — 1931 — *in* HUNTINGTON, E. — 1931.

o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 41

Fig. *A* — Campo com "capão".
Fig. *B* — Detalhe de um "capão".

Estampa 42

Figs. *C* e *D* — Frutificação de *Merostachys fistulosa* DOELL., forma normal.

Estampa 43

Figs. *E* e *F* — Forma de campo de *Merostachys fistulosa* DOELL., em frutificação.

Estampa 44

Figs. *G* e *H* — Taquaral seco, de *Merostachys fistulosa* DOELL.

———o———



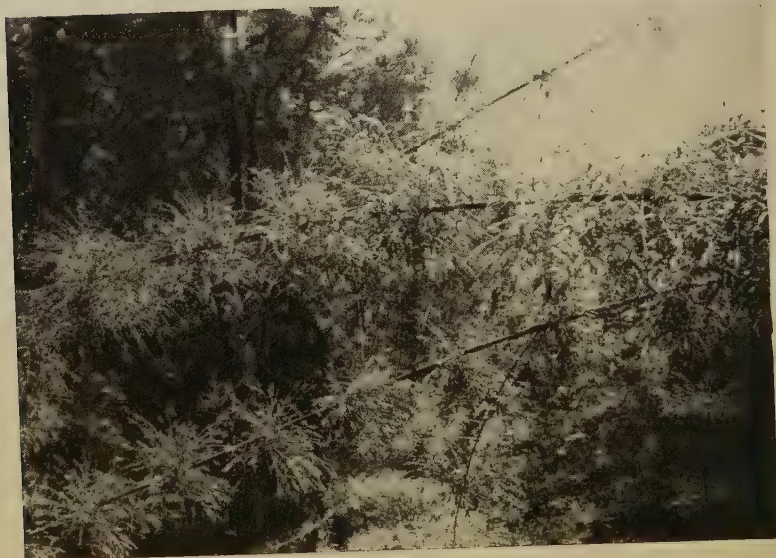
A



B



C



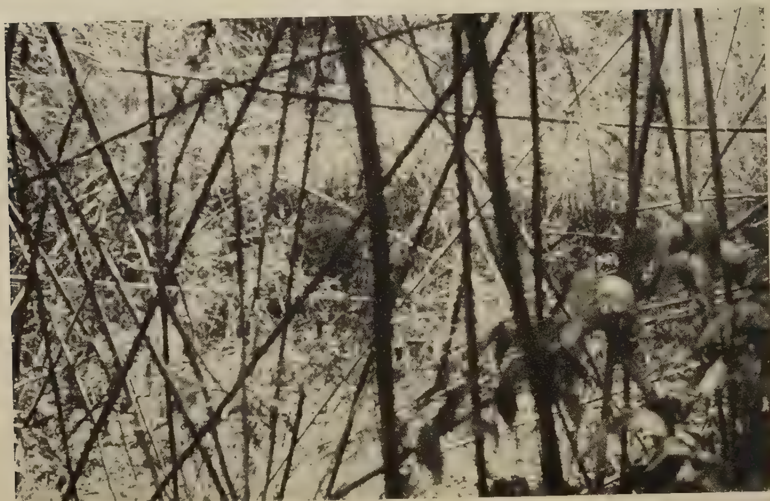
D



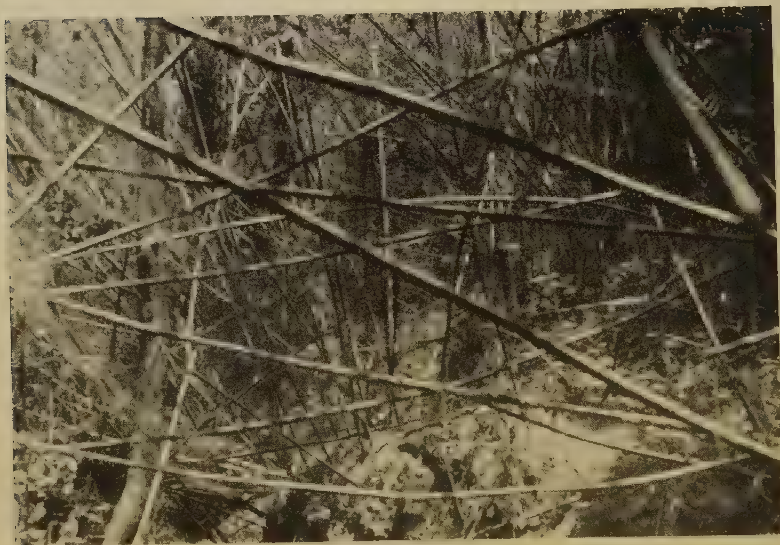
E



F



G



H

Vol. 12 — Art. 15 Novembro de 1941

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA SAÚVA
(ATTA spp. - HYMENOPTERA-FORMICIDAE)
I - EVOLUÇÃO DO SAÚVEIRO
(ATTA SEXDENS RUBROPILOSA FOREL, 1908)

POR

M. Autuori

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 4 figuras no texto e estampas 45-48

INTRODUÇÃO

Aqui pretendemos relatar não só as nossas observações sobre o desenvolvimento dos saúveiros (*), especialmente do ponto-de-vista de suas comunicações com o exterior, mas tambem outras, que fizemos no decorrer destes estudos, quanto ao comportamento do inseto. O desenvolvimento da parte subterranea do saúveiro será objecto de outros trabalhos nesta mesma série de "Contribuição para o conhecimento da saúva".

Pelos nossos conhecimentos bibliográficos parece esta a primeira vez que se acompanha e estuda o crescimento de saúveiros desde a penetração da içá (rainha) na terra até à libertação das novas formas sexuadas, aladas (revoada).

O caminho que seguimos para conhecer e documentar o desenvolvimento de saúveiros, em natureza, foi submeter a observação direta saúveiros conhecidos desde sua origem.

Para isso localisamos içás em lugares determinados de um campo experimental adrede preparado (Estampa 45, fig. *A*), o que nos permitiu não só seguir *pari passu* o desenvolvimento do saúveiro, como tambem ter à mão material abundante para pesquizas biológicas.

Nas primeiras linhas abaixo apresentamos em resumo um artigo publicado em 1937, na revista "O Biológico", no qual expuzemos o

(*) Saúveiro = formigueiro ou ninho de saúva.

nosso plano de trabalho relativo ao estudo da saúva e algumas observações já obtidas nos anos anteriores.

Dos terrenos que circundam o edifício do Instituto Biológico, em São Paulo, delimitamos uma área de 10.000 metros quadrados (50x200). Dividimos esse terreno em 100 quadras iguais (10x10ms) cada uma, numeradas de 1 a 100.

O terreno escolhido era mais ou menos plano, inculto, de vegetação rasteira, mostrando vestígios de saúveiros e cupinzeiros (ninhos de *Isoptera*) antigos.

Em 1933, três anos antes do início de nossos estudos, nesse mesmo terreno foram, com segurança, extintos, por meio de aplicação de gazes provenientes da combustão do enxofre aliado ao arsênico, os saúveiros e cupinzeiros que aí estavam então em franca atividade.

Em 1935 aguardamos a época da "revoada", que ocorre em São Paulo e estados visinhos nos meses de Setembro-Novembro. A revoada, como é do conhecimento geral, consiste no vôo nupcial das formas sexuadas, as quais então deixam o saúveiro em que se criaram, e, vôando, se encontram no ar, para a fecundação, depois do que as femeas descem à terra para iniciar a construção de novos saúveiros. Nessa ocasião colhemos elevado número de içás fecundadas, já privadas de suas asas e que foram transportadas para o campo experimental preparado para as receber. Desde então temos, todos os anos, repetido a operação, na mesma época.

A coleta de içás foi feita em saúveiros de antemão localisados nos arredores da cidade de São Paulo, tendo sido nossa preocupação transportá-las para o campo no mais curto tempo possivel, acondicionando-as separadamente em pequenos tubos de vidro.

Primeiro foi cada içá colocada no centro de uma quadra, cuja vegetação fôra previamente raspada; nos anos subsequentes um número maior era distribuido na superfície de cada quadra. Cada içá era coberta com um frasco de vidro de cerca de 20 cms. de diâmetro por 12 cms. de altura, ficando portanto com um campo limitado para o início da perfuração. A experiência demonstrou que é preciso evitar a ação direta dos raios solares sôbre os frascos de vidro. Em nosso campo costumamos cobrí-los com uma camada de folhagem. Várias dezenas de içás pereceram em menos de 15 minutos nos frascos não protegidos contra os raios solares, porquanto a temperatura elevada e a humidade que se desprende do solo, formam um ambiente que lhes é impróprio. Com a proteção da folhagem evitamos inteiramente esse inconveniente.

I — PENETRAÇÃO DA IÇÁ NA TERRA

Assim aprisionadas, permaneciam as içás durante algum tempo (de ½ a 12 ou mais horas), um tanto agitadas, procurando naturalmente uma saida. Em seguida, porem, a grande maioria iniciava a perfuração do canal, que daria origem ao novo saúveiro.

Iniciada a perfuração do canal, podiamos retirar o frasco sem que as içás abandonassem ou interrompessem o trabalho. A experiência demonstrou, porem, que tal medida oferece inconvenientes, pois são atacadas pelos pássaros, em geral e, em nosso caso, pelo pardal (*Passer domesticus*) que é notavel colaborador do homem na destruição de içás.

Por ocasião das revoadas, em formigueiros localizados próximos a centros urbanos, tivemos ocasião de verificar que esses pássaros, dizimavam as içás, aproveitando-se da ocasião em que elas surgiam do canal com a pelota de terra entre as mandíbulas para depositá-la no exterior. Observamos inúmeras vezes que os pardais esperavam durante vários minutos, no caso de alguma interrupção no trabalho da içá, até que esta reaparecesse; então, com um rápido salto, cortavam-nas, às vezes com um único golpe de bico, em duas porções, deixando no solo, frequentemente ainda com vida, a parte anterior, isto é, a cabeça e o torax com todos os apêndices intactos, levantando vôo com o abdomen da vítima preso ao bico. Várias vezes observamos içás, às quais um pardal havia arrancado o abdomen, continuarem e terminarem o seu trabalho. Vinhamos encontrar a içá ainda com vida, no interior da câmara inicial, até 24 horas após ter sofrido a mutilação.

Depois de excavado o canal, a içá principia a construção da câmara e aproveita a terra que vai retirando das paredes para obstruir o canal de entrada em toda a sua extensão. Raras vezes observamos obstrução que não fosse iniciada ao nivel do solo, e sim a dois ou mais centímetros abaixo. Durante a excavação do canal a içá desce para dentro dele de cabeça para baixo, voltando às arrecúas à superfície para largar a pelota de terra. Logo que a câmara oferece espaço suficiente, ela volta-se aparecendo de frente. Daí por diante o trabalho assume andamento mais acelerado; até o início da obstrução do canal gasta a içá de seis a dez horas contínuas, salvo alguns intervalos, de poucos minutos, durante os quais permanece no fundo do canal, aparentemente imovel.

Assim que a içá não mais era visivel no exterior, marcavamos o ponto exato onde ela penetrára, pois se enquanto não sobrevêm chuvas, as pelotas de terra que a içá retira, na ocasião da perfuração e que coloca ao redor do orifício, localizam perfeitamente o ponto do

canal, com as primeiras chuvas, que nessa época (Setembro a Dezembro) são fortes e abundantes, a terra solta é levada pelas águas e somente insignificante ou nenhum vestígio permanece. Afim de localizar permanentemente o ponto perfurado, procedemos do seguinte modo: retiramos uma camada de terra de três a cinco centímetros de espessura, aos lados da terra solta, de maneira a obter uma elevação quadrangular, de cerca de 20 cms. e cujo centro era o ponto de penetração da içá (Fig. 1).

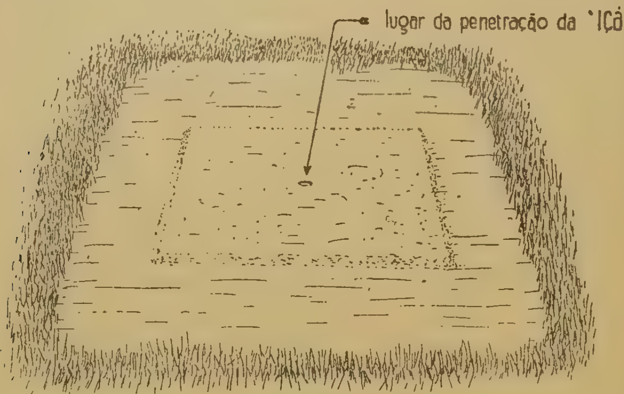


Fig. 1 - Marcação do lugar da penetração da içá na terra.

Verificamos várias vezes, na época das revoadas, a chegada de içás que pousavam espontaneamente em nosso campo e que provinham de saúveiros afastados. Essas içás foram aproveitadas para as nossas experiências. Este fato, aliado à existencia dos saúveiros extintos a que já nos referimos, faz-nos acreditar que o campo por nós escolhido é propício ao bom desenvolvimento de saúveiros.

O número de içás colocadas no campo, nos anos de 1936, 1937, 1938, 1939 e 1940, foi respectivamente de: 240, 980, 45, 402 e 170.

II — ABERTURA DO PRIMEIRO OLHEIRO

As primeiras formigas que nascem em um saúveiro entram em contacto com o exterior desobstruindo o canal que havia sido perfurado e em seguida obturado pela içá (Estampa 45, fig. *B*). Chamamos a esse canal o olheiro número um do saúveiro.

Damos abaixo, em tabelas, as datas e o número de dias decorridos entre a penetração da içá na terra e a abertura do olheiro n.º 1.

TABELA 1

Número de dias decorridos entre a penetração da içá e a abertura do 1.º olheiro

(Içás de 1936)

Numeração das içás	Data da penetração da "içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
1 A	6-12-36	24-2-37	80
4	21-11-36	23-2-37	94
7 D	6-12-36	25-2-37	81
8 A	6-12-36	20-2-37	76
14 C	6-12-36	3-3-37	87
16	21-11-36	16-2-37	87
16 B	6-12-36	20-2-37	76
22	21-11-36	20-2-37	91
22 A	6-12-36	7-3-37	91
23 A	6-12-36	6-3-37	90
25 A	6-12-36	26-2-37	82
26 B	6-12-36	7-3-37	91
27	21-11-36	15-2-37	86
27 A	6-12-36	24-2-37	80
27 C	6-12-36	22-2-37	78
30 B	6-12-36	22-2-37	78
34 A	6-12-36	25-2-37	81
35 A	6-12-36	26-2-37	82
38	21-11-36	26-2-37	97
39 B	6-12-36	27-2-37	83
42 E	6-12-36	6-3-37	90
43 B	6-12-36	26-2-37	82
44	21-11-36	25-2-37	96
51	21-11-36	16-2-37	87
55	21-11-36	20-2-37	91
55 A	6-12-36	18-2-37	74
58	21-11-36	16-2-37	87
61 A	6-12-36	26-2-37	82
71 B	6-12-36	3-3-37	87
73 A	6-12-36	20-2-37	76
99 B	6-12-36	3-3-37	87

TABELA 2

Número de dias decorridos entre a penetração da içá e a abertura do 1.º olheiro

(Içás de 1937)

Numeração das içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
1 A	18-10-37	7-2-38	112
1 D	19-10-37	4-2-38	108
2 C	18-10-37	4-2-38	109
2 F	19-10-37	7-2-38	111
3	18-10-37	11-2-38	116
3 D	19-10-37	14-2-38	118
3 F	19-10-37	4-2-38	108
4 A	9-11-37	8-2-38	91
4 D	9-11-37	8-2-38	91
4 E	10-11-37	4-2-38	86
5	18-10-37	9-2-38	114
5 A	18-10-37	5-2-38	110
5 G	18-10-37	7-2-38	112
6	18-10-37	7-2-38	112
6 A	18-10-37	7-2-38	112
6 D	18-10-37	28-1-38	102
6 G	18-10-37	4-2-38	109
6 H	10-11-37	12-3-38	94
7 F	18-10-37	7-2-38	112
9	18-10-37	7-2-38	112
12 F	9-11-37	3-2-38	86
14 G	10-11-37	10-2-38	92
18	9-11-37	7-2-38	90
19 H	9-11-37	7-2-38	90
20 D	9-11-37	3-2-38	86
20 H	9-11-37	27-1-38	79
23 B	9-11-37	8-2-38	91
23 D	9-11-37	10-2-38	93
31 F	9-11-37	5-2-38	88
33 F	9-11-37	19-2-38	102
34 C	9-11-37	4-2-38	87
35 F	9-11-37	2-2-38	85
33	9-11-37	3-2-38	86
37 A	10-11-37	23-2-38	105
38	10-11-37	5-2-38	87
39	9-11-37	5-2-38	88
42	9-11-37	7-2-38	90
42 C	10-11-37	7-2-38	89
42 G	9-11-37	12-2-38	98
43 E	9-11-37	10-2-38	93
43 H	10-11-37	2-2-38	84
45 A	9-11-37	10-2-38	93
45 E	9-11-37	10-2-38	93
46 B	10-11-37	14-2-38	96
47 A	10-11-37	11-2-38	93
47 C	10-11-37	31-1-38	82
48 I	11-11-37	4-2-38	85
49 D	10-11-37	15-2-38	97
51 B	9-11-37	7-2-38	90
53 F	10-11-37	4-2-38	86
55 A	9-11-37	4-2-38	87

(Continua)

TABELA 2 (Continuação)

Numeração das içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
56 G	10-11-37	5-2-38	87
58 B	10-11-37	29-1-38	80
58 C	9-11-37	10-2-38	93
58 E	10-11-37	2-2-38	84
59 B	9-11-37	7-2-38	90
59 C	9-11-37	23-2-38	106
59 E	9-11-37	14-2-38	97
59 F	10-11-37	8-2-38	90
59 G	9-11-37	7-2-38	90
60 B	9-11-37	12-2-38	95
61 G	9-11-37	4-2-38	87
62 B	10-11-37	12-2-38	94
62 D	10-11-37	8-2-38	90
62 E	9-11-37	7-2-38	90
62 I	10-11-37	7-2-38	89
63 A	9-11-37	5-2-38	88
64 H	10-11-37	7-2-38	89
66 C	10-11-37	7-2-38	89
66 E	10-11-37	7-2-38	89
68 G	9-11-37	4-2-38	87
67 C	10-11-37	10-2-38	92
68 I	10-11-37	17-2-38	99
70 I	9-11-37	23-2-38	106
73 B	10-11-37	4-2-38	86
73 F	10-11-37	8-2-38	90
73 G	10-11-37	10-2-38	92
74 G	10-11-37	31-1-38	82
75 A	10-11-37	10-2-38	92
77 E	10-11-37	9-2-38	91
78 C	10-11-37	31-1-38	82
79 F	9-11-37	15-2-38	98
80 F	9-11-37	7-2-38	90
80 G	9-11-37	7-2-38	90
81 D	10-11-37	7-2-38	89
81 H	10-11-37	12-2-38	94
82	10-11-37	9-2-38	91
83 G	10-11-37	17-2-38	99
84 C	10-11-37	10-2-38	92
84 H	10-11-37	8-2-38	90
85 B	10-11-37	14-2-38	95
85 I	10-11-37	7-2-38	89
86 I	10-11-37	9-2-38	91
87	10-11-37	9-2-38	91
87 H	10-11-37	9-2-38	91
88 F	10-11-37	12-2-38	94
88 H	10-11-37	15-2-38	97
89 F	10-11-37	5-2-38	87
89 G	10-11-37	5-2-38	87
89 H	10-11-37	7-2-38	89
98 A	10-11-37	7-2-38	89
98 E	11-11-37	18-2-38	99
98 I	11-11-37	16-2-38	97
100 F	11-11-37	7-2-38	99

TABELA 3

Número de dias decorridos entre a penetração da içá e a abertura do 1.º olheiro (Içás de 1938)

Numeração das içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
14 A	17-11-38	30-1-39	74
19 B	17-11-38	27-1-39	71
37 B	17-11-38	27-1-39	71

TABELA 4

Número de dias decorridos entre a penetração da içá na terra e a abertura do 1.º olheiro (Içás de 1939)

Numeração das içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
16 B	12-11-39	26-1-40	75
16 D	» » »	» » »	75
26 H	» » »	» » »	75
29	» » »	» » »	75
30 F	» » »	» » »	75
30 H	» » »	» » »	75
30 I	» » »	» » »	75
32 A	» » »	» » »	75
35 E	» » »	» » »	75
16	» » »	27-1-40	76
5 F	» » »	» » »	76
21 E	» » »	» » »	76
29 C	» » »	» » »	76
4 H	» » »	29-1-40	78
15 C	» » »	» » »	78
21 G	» » »	» » »	78
29 F	» » »	» » »	78
29 I	» » »	» » »	78
23 E	» » »	» » »	78
30 A	» » »	» » »	78
35 D	» » »	» » »	78
4 E	» » »	30-1-40	79
22	» » »	» » »	79
23 F	» » »	» » »	79
20 I	» » »	» » »	79
35 C	» » »	» » »	79
35 B	» » »	» » »	79
32	» » »	» » »	79
29 H	» » »	» » »	79
25 H	» » »	30-1-40	79
20 G	» » »	31-1-40	80

(Continua)

TABELA 4 (continuação)

Numeração das içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
12 H	12-11-39	31-1-40	80
7 H	» » »	» » »	80
5 B	» » »	» » »	80
2 A	» » »	» » »	80
31 A	» » »	» » »	80
50 D	» » »	» » »	80
47 A	19-11-39	1-2-40	74
45 D	» » »	» » »	74
48 C	» » »	» » »	74
50 A	» » »	» » »	74
7	» » »	8-2-40	81
8	» » »	» » »	81
12 F	» » »	» » »	81
15 E	» » »	» » »	81
25	» » »	» » »	81
50 B	» » »	» » »	81
50 E	» » »	» » »	81
48	» » »	» » »	81
48 C	» » »	» » »	81
47 B	» » »	» » »	81
46 G	» » »	» » »	81
46 H	» » »	» » »	81
45	» » »	» » »	81
41 E	» » »	» » »	81
41 I	» » »	» » »	81
49 G	» » »	9-2-40	82
48 G	» » »	» » »	82
46 B	» » »	» » »	82
41 G	» » »	» » »	82
41 A	» » »	10-2-40	83
45 B	» » »	» » »	83
49 F	» » »	» » »	83
10 I	» » »	12-2-40	85
15 A	» » »	» » »	85
25 A	» » »	» » »	85
25 C	» » »	» » »	85
25 F	» » »	» » »	85
23 G	» » »	» » »	85
32 D	» » »	» » »	85
47 A	» » »	» » »	85
22 B	» » »	15-2-40	88
48 C	» » »	16-2-40	89
33	» » »	» » »	89
33 D	» » »	» » »	89
3	» » »	17-2-40	90

TABELA 5

Número de dias decorridos entre a penetração da içá na terra e a abertura do 1.º olheiro

(Içá de 1940)

Numeração das Içás	Data da penetração da "Içá" na terra	Data da abertura do 1.º olheiro	Número de dias decorridos
170	23-10-40	15-1-41	84
60	» » »	» » »	84
55	» » »	16-1-41	85
51	» » »	» » »	85
46	» » »	» » »	85
45	» » »	17-1-41	86
40	» » »	» » »	86
48	» » »	18-1-41	87
87	30-10-40	23-1-41	85
146	» » »	30-1-41	92
140	» » »	» » »	92

Pelos números acima verifica-se que as médias de dias decorridos entre a penetração da içá e a abertura do 1.º olheiro, nos anos de 1936, 1937, 1938, 1939 e 1940, foram respetivamente de 84,8; 93,9; 72,0; 80,0; e 86,4, sendo 87,3 a média geral. O mínimo de dias foi 71 (1938) e o máximo 118 (1937).

III — PORCENTAGEM DAS IÇÁS QUE EVOLUIRAM

Pelos dados obtidos na experiência acima, pudemos tambem verificar o número de içás que evoluiram, e sua relação com o número de içás postas no terreno, o que pode ser apreciado na tabela seguinte.

TABELA 6

Porcentagem das içás que vingaram

Anos	Total de içás	Içás que não vingaram	Içás que vingaram	% das içás que vingaram
1936	240	203	37	15,4
1937	980	876	104	10,6
1938	45	42	3	6,6
1939	402	326	76	18,9
1940	170	159	11	6,4
Totais	1.837	1.606	231	12,6 média

Quanto à porcentagem obtida, é preciso notar que, devido à técnica por nós usada na ocasião da penetração das içás, eliminamos um fator de máxima importância, representado pelos inimigos naturais. Êste fator é capaz de reduzir de muito a porcentagem acima.

Verificamos tambem, que elevado número de içás não conseguiram levar avante novos saúveiros, suspeitando nós, à primeira vista, que nem todas estivessem providas de fungo na ocasião do vôo nupcial. Para elucidar êsse ponto, colhemos cerca de 400 içás que já haviam efetuado o vôo nupcial e procuravam iniciar a perfuração, e examinamo-las, uma a uma. Verificamos que todas eram portadoras do fungo. Observamos entretanto que a pequena porção de fungo não se apresentava, em todas as içás, com o mesmo aspecto, sendo mui poucas as de coloração clara, esbranquiçada. Na grande maioria a coloração era escura, enegrecida e de consistência flácida. Esta observação faz-nos admitir a possibilidade de nem sempre se achar em bôas condições para se desenvolver, o fungo que as içás levam do saúveiro onde se criam, o que impediria o início do novo saúveiro. Pretendemos esclarecer esse ponto oportunamente, por meio de semeadura de tais fungos em meio de cultura.

A técnica que usamos para averiguar a presença do fungo na içá e que nos permitiu examinar grande número delas em praso relativamente curto, consistindo apenas em comprimir entre dois dedos a parte anterior do torax da içá, verificando-se logo a expulsão do fungo, foi-nos indicada pelo Snr. José Vaz Pupo Nogueira, Chefe do Serviço de Extinção de Formigueiros da Prefeitura de São Paulo.

IV — ABERTURA DOS OLHEIROS 2-10

Pelas tabelas 1-5 vê-se que o primeiro olheiro é aberto pelas primeiras formigas após cerca de 87 dias, em média, a contar da penetração da içá na terra.

Damos a seguir, na tabela 7, os dados relativos ao número de dias necessários para a abertura dos 2.° ao 10.° olheiros.

Observando-se os números e as datas constantes da tabela 7, constata-se que o segundo olheiro aparece cerca de 14 meses (421,1 dias, em média) depois da abertura do primeiro olheiro e que os seguintes, até o 10.°, são abertos, inclusive o 2.°, dentro de 503,1 dias em média, com um máximo de 561 e um mínimo de 443 dias.

À medida que os nossos saúveiros se desenvolviam, fomos obrigados a sacrificá-los em sua maioria, porquanto o campo ia-se tornando pequeno para tão elevado número deles. Depois de certo tempo verificamos, com o aparecimento de novos olheiros, que se ia estabelecendo certa confusão, que não mais nos permitia saber com segurança a quais dos saúveiros pertenciam os olheiros novos. Por isso resolvemos deixar vivos somente quatro saúveiros, dos doze existentes; são os que correspondem aos números 36, 47c, 42 e 80f, localizados, os dois pri-

TABELA 7

Datas e números de dias decorridos entre a penetração da "içá" e a abertura dos olheiros 2 a 10.

Numeração dos saúveiros	Penetração da "içá" na terra.	Abertura do 1º olheiro	Tempo decorrido entre a penetração da "içá" na terra e a abertura do 1º olheiro.	ABERTURA DOS OLHEIROS 2 A 10									Tempo decorrido entre a abertura dos olheiros 1 a 10.								
				2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	1º ao 2º	2º ao 3º	3º ao 4º	4º ao 5º	5º ao 6º	6º ao 7º	7º ao 8º	8º ao 9º	9º ao 10º
	DATAS		DIAS	DATAS									DIAS								
16	9-11-937	7-2-938	90	27-4-939	5-5-939	5-5-939	5-5-939	10-5-939	15-5-939	27-5-939	28-5-939	30-5-939	444	8	0	0	5	5	12	1	2
36 °	9-11-937	3-2-938	86	15-2-939	15-3-939	2-5-939	3-5-939	4-5-939	13-5-939	30-5-939	31-5-939	1-6-939	377	28	48	1	1	9	17	1	1
39 J	9-11-937	5-2-938	88	26-4-939	4-5-939	19-6-939	19-6-939	5-7-939	6-7-939	11-7-939	14-7-939	17-7-939	445	8	46	0	16	1	5	3	3
42 °	9-11-937	7-2-938	90	15-1-939	2-3-939	7-3-939	10-4-939	18-4-939	10-5-939	30-5-939	2-6-939	2-6-939	342	46	5	34	8	22	20	3	0
45 D	9-11-937	10-2-938	93	18-4-939	15-5-939	12-6-939	13-6-939	26-6-939	12-8-939	14-8-939	17-8-939	19-8-939	432	27	28	1	13	47	2	3	2
47 C	10-11-937	31-1-938	82	20-2-939	19-4-939	4-5-939	8-5-939	25-5-939	12-6-939	12-7-939	14-7-939	15-8-939	385	58	15	4	17	18	30	2	32
56 f	10-11-937	2-2-938	84	15-5-939	16-6-939	17-6-939	11-7-939	3-8-939	* –	–	–	–	467	32	1	24	23	–	–	–	–
59 C	9-11-937	3-2-938	86	15-5-939	16-6-939	24-6-939	26-6-939	26-6-939	1-7-939	7-7-939	9-7-939	15-7-939	466	32	8	2	0	5	6	2	6
63 B	9-11-937	5-2-938	88	16-3-939	18-4-939	4-5-939	8-5-939	10-5-939	15-5-939	25-5-939	2-6-939	2-6-939	404	33	16	4	2	5	10	8	0
78 H	9-11-937	31-1-938	83	15-5-939	22-6-939	11-7-939	* –	–	–	–	–	–	469	38	19	–	–	–	–	–	–
80 ξ	10-11-937	7-2-938	89	15-4-939	20-4-939	29-4-939	17-5-939	3-6-939	7-6-939	13-6-939	13-6-939	16-6-939	432	5	9	18	17	4	6	0	3
83 i	10-11-937	16-2-938	98	14-3-939	3-4-939	18-4-939	9-5-939	15-5-939	20-5-939	12-6-939	13-6-939	16-6-939	391	20	15	21	6	5	23	1	3

° - Vide gráfico (Fig. 2)   * - Formigueiros extintos

A.R.Marra

meiros, na parte central do terreno e dos dois outros, um em cada extremo.

A extinção dos oito saúveiros foi efetuada por meio de aplicação de gazes provenientes da combustão do enxofre aliado ao arsênico

branco, de maneira que todos os canais pertencentes a um determinado saúveiro eram assinalados pela fumaça inseticida. Sempre aplicamos a máquina extintora no olheiro n.º 1 de cada saúveiro. Pudemos assim retificar dois enganos que haviamos cometido atribuindo a um formigueiro canais de formigueiros diferentes.

Com os quatro saúveiros assim bem distanciados, pudemos acompanhar durante algum tempo, com segurança, o seu crescimento, marcando por meio de estacas numeradas, diariamente, os olheiros novos que apareciam (Estampa 46, fig. *C*).

O número de olheiros, do segundo ano em diante, aumentou consideravelmente, conforme poderá ser visto no gráfico n.º 1, e nessa ocasião, mais uma vez, verificamos que poderia ocorrer outra confusão entre os novos olheiros, porquanto os canais de colheita de material avançavam cada vez mais longe do centro do saúveiro. Resolvemos, pois, abrir três valetas de cerca de 2 metros de profundidade, cortando todo o campo na sua largura de 50 metros, separando, assim, os saúveiros. Essas valetas foram julgadas suficientes para o nosso escopo por não haver probabilidade de passarem os canais dos formigueiros em nivel mais profundo, porquanto em nosso campo nunca os verificamos a mais de 1,80 cms. de profundidade.

V — CICLO COMPLETO DE SAÚVEIROS

Acompanhamos o desenvolvimento externo, completo, de três dos saúveiros de nosso campo experimental (n.os 80F, 36 e 42), como poderá ser visto no gráfico n.º 1.

Consideramos esses saúveiros como "adultos", porquanto o seu ciclo, iniciado com a penetração da içá na terra, completou-se por ocasião da revoada, isto é, do vôo nupcial das formas aladas e sexuadas que neles se criaram. Esse fenômeno foi verificado nos três saúveiros, em 12 de Dezembro de 1940, às 16 horas.

No decorrer dessas verificações anotamos que do 4.º ao 10.º mez, depois da penetração da içá na terra, apareceram no exterior dos vários saúveiros as operárias propriamente ditas, pertencentes a todas as castas dessa categoria de indivíduos, com exclusão dos "soldados", que somente apareceram 22 mezes após o início do saúveiro.

A revoada, e portanto o aparecimento exterior das formas sexuadas, deu-se 38 mezes após a penetração da içá na terra.

Na tabela abaixo (n.º 8) vê-se a época em que se deram esses vários fenômenos, inclusive o da "mudança" nos diversos saúveiros. (Sobre a "mudança" vide cap. 11).

TABELA 8

Época do aparecimento das várias castas e "mudança" nos saúveiros

Numeração dos saúveiros	Penetração das içás na terra	Aparecimento das operarias	Aparecimento dos "soldados"	Mudança (3)	Prerrevoada	Revoada
80 f.	10-11-37	Fev. Ag.º 38	Agosto 39	Jan. 41	Nov. Dez. 40	Dez. 40
36	9-11-37	Fev. Set. 38	Agosto 39	Dez. 39	Nov. Dez. 40	Dez. 40
18	9-11-37	Fev. Set. 38	Setemb. 39	Jan. 40	(1)	—
42	9-11-37	Fev. Ag.º 38	Setemb. 39	(2)	Nov. Dez. 40	Dez. 40
98 i.	10-11-37	Fev. Set. 38	Setemb. 39	Abr. 40	(2)	—
45 a.	9-11-37	Fev. Out. 38	Novem. 39	(2)	—	—

(1) Não mudou (2) Foi extinto (3) Vide cap. 11

No gráfico n.º 1 temos assinalado, em Novembro de 1937, o ponto em que as três içás penetraram no solo (para detalhes vide tabela n º 9) sendo esse, portanto, o início dos três saúveiros; em fevereiro de 1938 abriram o 1.º olheiro e em dezembro de 1938, janeiro e março de 1939, abriram o 2.º olheiro.

Acompanhando-se os dados da tabela n.º 9 e os do gráfico n.º 1, verificamos que um saúveiro de 2 anos de idade é muito menor do que geralmente se acreditava. Entretanto, dessa época em diante o desenvolvimento do saúveiro toma ritmo acelerado, pelo que, dentro de mais um ano, assume proporções que ultrapassam as que eram geralmente imaginadas entre nós. Após vinte e quatro meses, a contar do seu início, os saúveiros n.os 42, 36 e 80f. apresentavam respetivamente 63, 113 e 53 olheiros. Passados mais 14 meses, isto é, em dezembro de 1940, época em que se deu a revoada, os três saúveiros tinham, respectivamente, 853, 984 e 1.071 olheiros. Isso quer dizer que em 14 meses, comparando-se com os 24 meses iniciais, os três saúveiros aumentaram 12,9; 7,6; e 17,6 vezes o número de seus olheiros, respetivamente.

Como já tivemos ocasião de dizer, a data do aparecimento dos olheiros, no campo experimental, era anotada diariamente, colocandose junto de cada novo olheiro, uma estaca numerada, diferentemente para cada saúveiro.

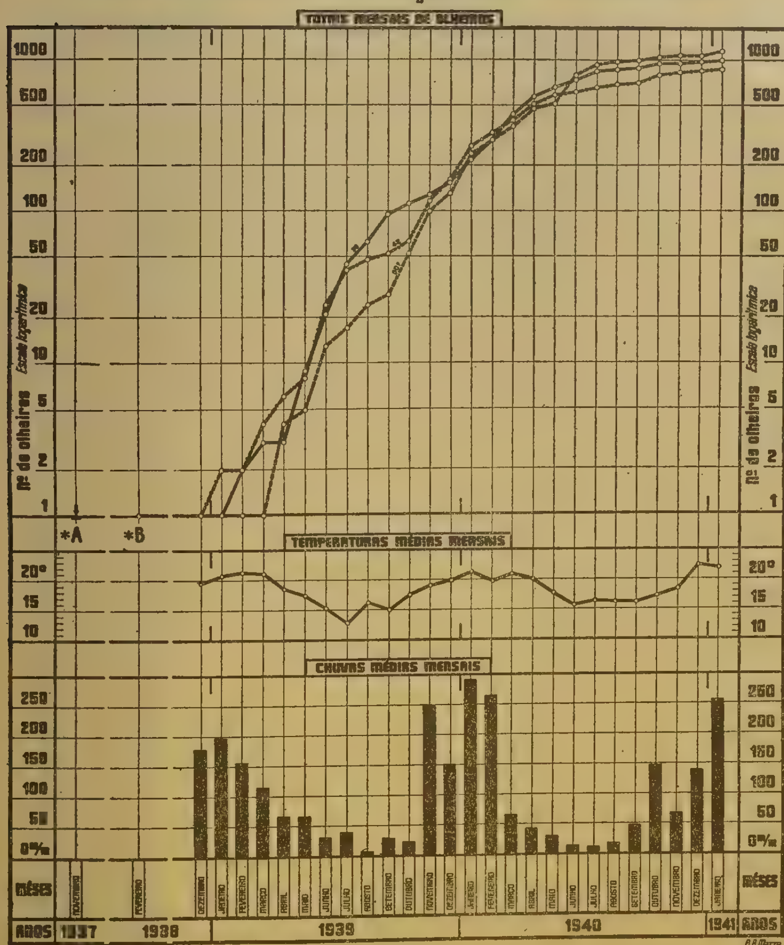
Para confecção do gráfico (Fig. 2) tomamos como base de crescimento o número mensal de olheiros abertos, obtidos pela soma dos dados diários de cada saúveiro.

O acréscimo dos olheiros nos saúveiros não é muito regular, porquanto, pelas nossas observações de campo, verificamos que as atividades principais das saúvas, representadas pelo carregamento de materiais e pela abertura de novos

canais e panelas, são mais ou menos alternadas, de maneira que durante vários dias seguidos a grande maioria das saúvas trabalham numa só das atividades acima citadas.

DESENVOLVIMENTO DE SAÚVEIROS

Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908



* A – Data da penetração da "içá" na terra } Nos 3 saúveiros (80 F, 36 e 42)
* B – Data da abertura do 1º olheiro

Fig. 2

A curva do gráfico (Fig. 2) mostra que o crescimento nos três saúveiros foi, contra toda a nossa previsão, muito regular, atingindo o máximo de regularidade nos meses de novembro e dezembro, época em que se deu a revoada.

Na tabela n.º 9, é dado o acréscimo mensal dos olheiros nos três saúveiros e a sua soma.

TABELA 9

Número de olheiros abertos mensalmente e sua soma nos saúveiros ns. 36, 42 e 80f.

Anos e meses	Saúveiro n.º 36		Saúveiro n.º 42		Saúveiro n.º 80 f.	
	Parcelas	Totais	Parcelas	Totais	Parcelas	Totais
1938						
Fevereiro	1	1	1	1	1	1
Março	0	1	0	1	0	1
Abril.	0	1	0	1	0	1
Maio.	0	1	0	1	0	1
Junho	0	1	0	1	0	1
Julho	0	1	0	1	0	1
Agosto	0	1	0	1	0	1
Setembro	0	1	0	1	0	1
Outubro	0	1	0	1	0	1
Novembro.	0	1	0	1	0	1
Dezembro.	0	1	0	1	0	1
1939						
Janeiro	0	1	1	2	0	1
Fevereiro	1	2	0	2	0	1
Março	1	3	2	4	0	1
Abril.	0	3	2	6	3	4
Maio.	6	9	2	8	1	5
Junho	12	21	16	24	8	13
Julho.	24	45	17	41	4	17
Agosto	18	63	7	48	7	24
Setembro	33	96	4	52	4	28
Outubro	17	113	11	63	25	53
Novembro.	17	130	54	117	47	100
Dezembro.	26	156	46	163	32	132
1940						
Janeiro	65	221	105	268	108	240
Fevereiro	71	292	62	330	56	296
Março	147	439	64	394	64	360
Abril.	141	580	117	511	118	478
Maio.	76	656	80	591	36	514
Junho	90	746	30	621	283	797
Julho	106	852	45	666	126	923
Agosto	18	870	18	684	47	970
Setembro	32	902	20	704	44	1014
Outubro	43	945	95	799	22	1036
Novembro.	21	966	41	840	25	1061
Dezembro.	18	984	13	853	10	1071
1941						
Janeiro	15	999	26	879	36	1106
Totais	999		879		1106	

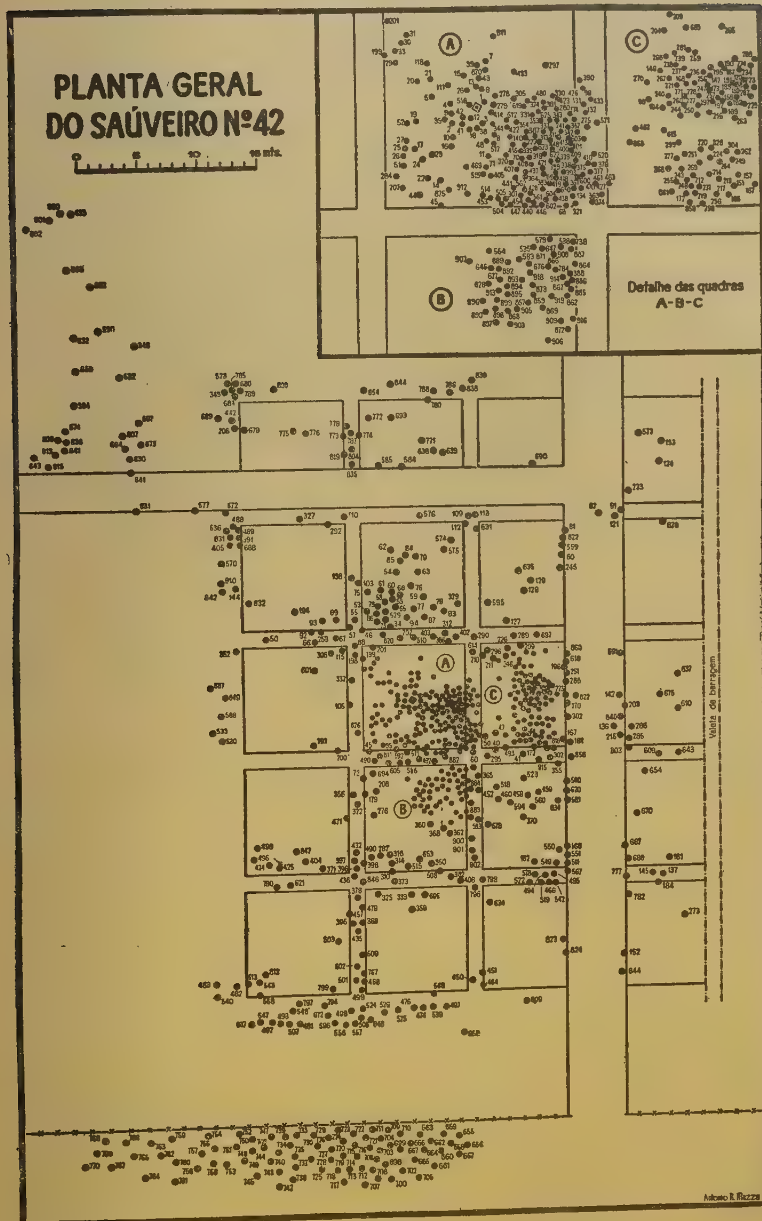

PLANTA GERAL
DO SAÚVEIRO Nº42
0 5 10 15 mts.
Detalhe das quadras
A-B-C
Valeta de barragem
Antonio R. Piazza

Fig. 3

VI — EXPANSÃO E ATIVIDADE DOS OLHEIROS

A expansão dos olheiros de um saúveiro dá-se de maneira irregular. No mapa (Fig. 3) pode ver-se que o aparecimento dos olheiros não se dá em áreas concêntricas, relativamente ao olheiro inicial, n.º 1. Não ha pois uma expansão regular do saúveiro, estando a distribuição dos olheiros intimamente relacionada com o feitio e composição do terreno, com a localização das plantas a serem atacadas e possivelmente com outros fatores ainda não verificados.

Assim temos que, ao lado dos primeiros olheiros abertos, que são representados por numeração baixa, pois a sequência da numeração é cronológica, encontram-se, a pouca distância do olheiro n.º 1, números altos, ao passo que a distâncias maiores encontram-se números baixos.

Nem todos os olheiros estão sempre em atividade. Observamos que no saúveiro n.º 42, com 936 olheiros, os que se apresentavam abertos variavam em número constantemente, conforme poderá ser visto na tabela abaixo, n.º 10.

TABELA 10

Variações na atividade dos olheiros

Data	Olheiros		Total de Olheiros
	Abertos	Fechados	
2/4/1941	416	520	936
9/4/1941	487	449	936
24/4/1941	474	462	936
14/5/1941	556	380	936
26/5/1941	566	370	936

Êsses dados foram tomados em época de sêca, de maneira que os olheiros não foram fechados por causa das chuvas, como sempre acontece.

VII — ESTABILIZAÇÃO DO NÚMERO DE OLHEIROS

Pelas nossas observações, parece que o saúveiro alcança seu máximo desenvolvimento após cerca de três anos a contar da fundação. Este máximo de desenvolvimento parece coincidir com a primeira revoada. De fato, nos dois únicos saúveiros (42 e 47c) que até o presente não "mudaram" (sobre este fenômeno vide capítulo XI), e não foram portanto perturbados em seu desenvolvimento normal, por esse fato, o aumento do número dos olheiros nestes últimos cinco meses, após a confecção do gráfico (Fig. 2), foi pequeno.

Resta averiguar si, por ocasião da época próxima à segunda revoada, isto é, de setembro a dezembro de 1941, o saúveiro tomará novo incremento, aumentando de muito o número atual de olheiros.

Infelizmente, é muito provavel que tal observação não possa ser verificada este ano, porquanto, devido aos fenômenos da mudança dos saúveiros para pontos afastados do campo experimental e aos estragos que as formigas estão causando ao Parque do Instituto Biológico e seus arredores, seremos dentro em breve obrigados a sacrificar esses saúveiros, de modo que, somente em outra ocasião e em lugares mais afastados, outros poderão ser mantidos e observados durante mais de quatro anos.

VIII — O VÔO DAS FORMAS SEXUADAS

O vôo nupcial das formas sexuadas que no Brasil é chamado "Revoada", é sem dúvida o fenômeno de maior importância para a sobrevivência da espécie. Para que isso se dê com segurança, o saúveiro liberta em grande quantidade as futuras fundadoras das novas colonias. E antes de conseguir uma relativa segurança para si e para a futura prole, as novas rainhas passam por inúmeros perigos, representados por seus inimigos naturais.

Pudemos verificar que a Revoada apresenta duas fases bem distintas, que passaremos a denominar: a primeira, Prerrevoada e a segunda, Revoada propriamente dita. EIDMANN, 1935, entreviu as duas fases do fenômeno não tendo, porem, presenciado os seus limites.

a) Prerrevoada. Caracterizam a prerrevoada: o aspecto característico dos olheiros do saúveiro prestes a entrar em revoada e o alvoroço das formigas. Isto se nota durante um periodo de tempo variavel que precede sempre a revoada. O início da prerrevoada dá-se de uma a quatro ou cinco semanas antes da revoada.

Aspecto dos olheiros. Na prerrevoada os olheiros apresentam-se perfeitamente limpos, abertos e com os contornos bem delineados (Est. 46, fig. *D*). Os canais são alargados logo abaixo dos olheiros, estreitando-se na entrada. Nem sempre esse estreitamento se dá em toda a circunferência do olheiro, sendo às vezes assimétrico, de maneira que o olheiro se apresenta com contorno em semicírculo. Os olheiros assim descritos dão ao formigueiro um aspecto bem característico e completamente diferente do comum.

Alvoroço das formigas. Em dias quentes, de trovoadas e ameaças de chuva, os saúveiros mostram, nas horas mais quentes do dia, uma agitação insólita. Tivemos ocasião de observar saúveiros antes e durante essa fase, por várias vezes. Vamos pois dar

uma descrição desse curioso fenômeno, observado em um grande saúveiro.

À beira de uma estrada de pouco movimento, num bairro novo das redondezas da cidade de São Paulo, localisamos um saúveiro de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, com os seguintes característicos: a terra fofa constituia um grande oval, medindo na sua máxima largura 3,20 cms. e no máximo comprimento, 6 metros. Contamos, na terra fôfa, de 100 a 130 olheiros maiores, bem visiveis. A altura máxima da terra fôfa era de 45 cms.

A estrada onde se achava localizado esse saúveiro era limitada por mata (capoeirão).

Durante toda a primeira quinzena do mês de Novembro de 1939 íamos diariamente, nos dias de sol, a esse bairro, e percorríamos os diversos saúveiros anteriormente localizados, com o fim de observar o fenômeno da revoada e colher o material necessário para o prosseguimento de nosso trabalho experimental.

Em 14 de novembro chegamos ao local acima mencionado às 13 horas, e durante cerca de um hora nada de anormal observamos no saúveiro. No entanto o dia nos pareceu propício para a revoada, porquanto a temperatura era bem elevada e ao mesmo tempo ouviamos espaçadamente trovoadas como prenúncio de próximas chuvas. Após uma hora e meia de espectativa começamos a notar o aparecimento de formigas pertencentes à casta dos soldados, em número elevado. O número dessas formigas aumentava rapidamente com sua saída de todos os olheiros ao mesmo tempo, e elas espalhavam-se pelo chão, ao redor do saúveiro, como uma grande mancha de óleo. Dentro de alguns minutos o número de soldados e de operárias que tambem já estavam presentes era tão elevado, que já não podiamos permanecer perto do saúveiro, sendo obrigados a nos afastar aos poucos, até ficar a mais de 10 metros de distância do ponto inicial. A área de terreno ao redor do saúveiro ficou completamente tomada pelas formigas; estas, principalmente os soldados, andavam de um lado para outro, com as mandíbulas abertas, prontas para morder o que quer que aparecesse no seu caminho. A princípio, o avanço das formigas deu-se para o lado em que estavamos, obrigando-nos a recuar. Mudamos de lugar diversas vezes, a título de experiência, e sempre observamos que, após alguns minutos, o exército de formigas se dirigia para nosso lado. Após cerca de 20 minutos, a contar da saìda dos primeiros soldados, ficou a estrada, numa área de cerca de 150 metros quadrados, completamente tomada pelas formigas. Esse trecho de estrada, visto a certa distância, dava a impressão de estar coberto por um tapete escuro e movediço.

Contornamos o saúveiro e penetramos na mata, com a esperança de poder melhor observar o centro do saúveiro, abrigados pela vegetação. Mas esse lado tambem estava completamente dominado pelas formigas, não só na parte térrea como tambem em todos os arbustos e árvores.

Resolvemos então entrar no automovel e avançar com ele até bem perto do saúveiro. Aí, sentados sobre os paralamas do carro, pudemos observar bem de perto o movimento do centro do saúveiro. Os pneumáticos do carro isolavam-nos das formigas. O cheiro ativo da borracha afugentava a quasi totalidade delas. Assim mesmo, uma ou outra conseguia subir pelas rodas e tentava atacar-nos. Caracteriza-se pois o que observamos, pela formação de uma zona ocupada pelas formigas, que correm desordenadamente de um lado para outro sobre o formigueiro e em volta dele, com tendência a extender-se para o lado em que se aproxima um ser extranho.

Já nessa ocasião, em volta dos olheiros e pelos canais a dentro, ocupando boa parte da superfície de terra fôfa, notávamos a presença das formas aladas, machos ("bitús") e fêmeas ("içás"), que aí permaneciam durante algum tempo, quasi imóveis (Estampa 47, figs. *E* e *F*). De um outro olheiro afastado 6-7 metros, fora portanto da terra fôfa, tambem saíam formas aladas.

Nesse saúveiro o número de machos era notavelmente superior ao das fêmeas, numa proporção aproximada de seis para um.

Revoada. As muitas centenas de machos e fêmeas começaram repentinamente a ensaiar o vôo. Na maioria subiam para os pontos mais altos dos montes da terra fôfa e aí faziam vibrar as asas. De vez em quando levantava vôo uma fêmea e logo em seguida partiam diversos machos. Esses vôos isolados, de uma ou outra fêmea, foram-se tornando cada vez mais frequentes, até tomarem um ritmo contínuo. A revoada tornava-se geral. Tambem dos arbustos e das árvores mais próximas do saúveiro, uma multidão de machos e fêmeas levantava vôo.

Os primeiros 5-10 metros de vôo são vencidos pelas formigas em direção quasi vertical, à maneira de minúsculos autogiros. A içá levanta o vôo conservando o abdomen caido para baixo. Essa primeira parte do vôo não é rápida e permite seguir-se a formiga com a vista desarmada. Alcançando certa altura, a formiga toma o sentido horizontal e a velocidade aumenta rapidamente, não sendo possivel acompanhá-la com a vista por mais de 2 ou 3 segundos. Nessa altura a formiga e impelida pelas correntes de ar, notando-se que a direção tomada é a mesma para todas. Algumas tentam vencer a corrente e tomar sentido oposto, mas não o conseguem.

Nem sempre a prerrevoada é seguida da revoada propriamente dita. Em vários saúveiros que se comportavam durante a prerrevoada exatamente como foi acima descrito, as formigas espalhadas ao seu redor recolhiam-se e a revoada não se dava. Neste caso era interessante notar que as operárias maiores impediam as içás e os bitús de levantar vôo, segurando-os e arrastando-os para dentro dos olheiros.

Outro fato tambem interessante que se nota durante o alvorôço das formigas é que todo inseto, ou mesmo qualquer outro pequeno animal que por acaso se encontre ou cáia nas proximidades do saúveiro, é imediatamente atacado e estraçalhado, ou então arrastado para dentro do ninho.

IX — AGRESSIVIDADE DAS SAÚVAS

EIDMANN em 1935, no capítulo "Comportamento com relação a outras colônias", afirma que as saúvas quando não agredidas, são pacíficas, não atacando formigas pertencentes a outras sociedades da mesma espécie e até de espécies diferentes. Essa indiferença a outros indivíduos, segundo aquele autor, manifesta-se entre fêmeas novas, aladas, de colônias diferentes e tambem entre fêmeas novas e soldados extranhos.

Várias observações por mim feitas levam-me a discordar completamente de EIDMANN, no que se refere ao comportamento entre indivíduos, seja da mesma espécie, mas de origem diferente, seja de espécies diferentes, ou ainda entre fêmeas aladas, jovens e operárias, de formigueiros diversos.

O comportamento de formigas da mesma espécie, mas de ninhos diferentes, é tratado com detalhes no capítulo seguinte (Luta entre saúveiros). Quanto às relações entre formigas de espécies diferentes, foram feitas várias experiências que passo a descrever. Em meu laboratório mantenho, ha mais de dois anos, vários ninhos de formigas cortadeiras pertencentes às seguintes espécies: *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (dez colônias), sendo 8 iniciais (Estampa 48, fig. *G*) e duas grandes, já com todas as castas, com excepção das formas aladas; *Atta laevigata* FRED. SMITH, 1858 (uma colônia grande) e *Atta bisphaerica* FOREL, 1908 (uma colônia grande), alem de quatro ninhos grandes de *Acromyrmex* spp. Êsses formigueiros de laboratório são todos mantidos isolados sôbre mesas em cujos pés latas contendo um líquido repelente as isolam do assoalho. A folhagem e outros materiais dados diariamente aos formigueiros maiores são colocados a certa distância dos frascos com "esponja", de maneira que as formigas são obrigadas a percorrer cerca de 2 metros para chegar até o alimento do fungo, formando verdadeiros "carreiros" sôbre as mesas. Nessas condições é muito fácil fazer experiências sobre a agressividade de tais

formigas. Sempre verificamos que formigas de saúveiros de espécies diferentes, quando colocadas nos carreiros de formigas de outras espécies, são imediatamente atacadas e mutiladas, permanecendo, às vezes, horas e horas seguidas, presas umas às outras, e sendo quasi impossivel separá-las, sem, ao tentar faze-lo, arrancar-lhes apêndices. Em geral verificamos que não são os soldados os mais ferozes e os que primeiro percebem a presença de indivíduos extranhos. As operárias pertencentes à casta acima das menores é que, em geral, se mostram mais agressivas e lançam-se sobre o indivíduo extranho mesmo em se tratando de um exemplar grande, agarrando-se a uma de suas patas. A formiga extranha, logo que se sente atacada, cái e tenta livrar-se da minúscula atacante, que se deixa arrastar pela vítima sem largá-la, até que outras venham em seu auxílio e acabem de dominar completamente a intrusa. O mesmo acontece quando se lança uma fêmea jovem, alada, num carreiro da sua própria espécie, mas de colônia diferente. De uma destas lutas possuimos documentação cinematográfica, em que se pode observar o elevado número de vítimas, entre os atacantes, porquanto a fêmea, antes de ser dominada e carregada para fora, defende-se ferozmente, desferindo golpes de mandíbulas, que chegam a cortar ao meio um adversario.

Um fato interessante, evidente em todas as experiências, é o seguinte: si apanharmos uma operária de um dos carreiros dos nossos ninhos em observação, e a segurarmos por alguns instantes entre os dedos, sem a ferir, ao tornar a colocá-la no mesmo carreiro, verificamos que ela é imediatamente atacada pelas companheiras. Várias destas se agarram às suas patas e antenas, imobilisam-na, nunca tendo sido notado, por parte da formiga atacada, qualquer movimento de defesa. As formigas atacantes, por sua vez, limitam-se a mantê-la presa durante certo tempo que varia de minutos até cerca de um hora. Depois desta "formalidade" a prisioneira é solta e deixada em liberdade, retomando, junto das companheiras, o seu trabalho normal. Si, entretanto, a formiga for apanhada por meio de uma pinça, e recolocada no carreiro, nada de anormal se nota, salvo a "curiosidade" de uma ou outra formiga que, às vezes, se aproxima e apenas tateia com as antenas a recenchegada. Trata-se, sem dúvida, de uma questão de odor, com o qual a formiga tocada pelo homem fica impregnada e que, a princípio, alarma as companheiras; estas, percebendo afinal o "engano", deixam-na em liberdade depois de algum tempo, talvez o suficiente para que o cheiro extranho desapareça. No entanto, as formigas de espécies diferentes, tenham tido contacto com a pele humana ou não, são atacadas rápida e ferozmente.

X — LUTA ENTRE SAÚVEIROS

Em capítulo anterior ("ciclo do saúveiro") referimo-nos à separação das zonas ocupadas por saúveiros vizinhos, por meio de uma valeta. No decorrer destes estudos observamos que dois canais pertencentes aos saúveiros ns. 42 e 36 desembocaram, vindo de direções opostas, na valeta divisória; então assistimos a uma luta entre as saúvas. E' preciso notar que ambos os saúveiros pertenciam a *Atta sexdens rubropilosa* FOREL. A luta desenrolou-se durante cerca de 30 dias seguidos. Nela não se empenharam em massa as duas populações, nem houve um andamento acelerado. A luta foi lenta e continua, apenas entre as formigas que se iam encontrando com as do outro canal. À medida que alguns indivíduos surgiam do canal do saúveiro n.º 36, outros saíam do canal oposto, do saúveiro n.º 42, e então se atracavam e permaneciam presos, aos pares na maioria das vezes, rolando pelo chão durante várias horas; às vezes cinco ou seis saúvas pequenas lutavam contra uma ou duas de casta maior, formando assim uma pequena aglomeração. Quasi nunca havia vencedoras, porque presas umas às outras acabavam morrendo todas. Algumas conseguem sair da luta com vida, mas sempre mutiladas, principalmente nas patas e nas antenas, mas eram logo atacadas por inimigos recenchegados e a disputa recomeçava. Formigas de todas as castas tomaram parte nesse combate. Após alguns dias, notava-se no chão da valeta uma massa escura formada por milhares de formigas mortas (Estampa 48, fig. *H*). A luta terminou sem vencedores e sem tentativa recíproca da invasão de canais. Depois de uns 30 dias e da morte de vários milhares de saúvas, aproximadamente 3.000, os dois canais foram abandonados e nada mais se verificou de anormal no campo de luta.

Em outra ocasião observamos uma luta de proporções menores, que durou, com intensidade, apenas cerca de três horas. Esta luta travou-se entre dois saúveiros tambem pertencentes a *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, não muito desenvolvidos, da seguinte maneira: uma laranjeira foi atacada por formigas de um carreiro proveniente de um dos saúveiros. As saúvas se espalharam pela árvore e iniciaram o corte das folhas. Pouco mais tarde começaram a chegar, de outro ponto, formigas que à medida que se aproximavam da árvore, eram atacadas pelas que ali já se achavam. As formigas que chegaram em segundo lugar eram, a princípio, em número reduzido; este foi porem aumentando e, dentro de uns 20 minutos, já se havia tornado bem grande ao redor da laranjeira, alimentado por dois carreiros bem distintos vindos de direções opostas. Nessa altura observamos que, enquanto boa parte das saúvas, em plena confusão, lutava de maneira semelhante à acima descrita, outras continuavam o corte

das folhas, carregando-as cada qual para o seu lado. A laranjeira, cujo número de folhas não era elevado, por haver sofrido ataques anteriores, dentro de três horas, mais ou menos, ficou completamente desprovida das folhas, recolhendo-se então as formigas aos seus respetivos saúveiros, deixando no campo companheiras ainda empenhadas na luta. No dia seguinte encontramos no mesmo sítio alguns grupos de formigas presas umas às outras, no meio de várias centenas de companheiras mutiladas e mortas, que numerosas formigas do gênero *Solenopsis* transportavam para longe do campo de batalha.

XI — MUDANÇA DE SAÚVEIROS

Os quatro saúveiros poupados permaneceram dentro da área inicial do campo experimental (10.000 ms. quadrados) durante cerca de 30 meses. Em III-1940 os canais começaram a se extender em várias direções, de maneira a ampliar-se a área ocupada para mais de três vezes em relação ao seu tamanho primitivo. Tambem notamos que a zona central ou parte vital dos saúveiros n.os 36 e 80 se deslocou de um ponto para outro. O centro, ou melhor a zona vital de um saúveiro, que é o ponto onde se encontraram as panelas habitadas, corresponde, nos que nunca foram molestados, seja por ataques mal sucedidos do homem, seja por excavações feitas por tatús *(Dasypodidae)* — àquela área, na superfície do terreno em que os olheiros se mostram aglomerados e relacionados com a elevação formada pela terra solta, que as formigas retiram do subsolo ao efetuar a abertura de novas panelas. O deslocamento de nossos saúveiros para outro ponto, distante 20, 50 e até 200 metros, conforme veremos mais adiante, era facilmente percebido, dado o aparecimento de novos grupos de olheiros, acompanhados dos montículos de terra solta, todos em franca atividade. Nos olheiros do lugar abandonado pelo saúveiro não mais havia atividade, em consequência do que a terra solta passava a se acamar e a cobrir-se, pouco a pouco, de vegetação espessa e entrelaçada. Das panelas abandonadas, algumas ficavam entulhadas de terra.

Estas observações puderam ser realizadas com facilidade e segurança por meio de perfurações exploradoras feitas com a "Perfuradora J. P.", que o snr. José Vaz Pupo Nogueira ideou e introduziu com sucesso no combate à saúva (Autuori, 1940a). Todas as vezes que se perfuram panelas em atividade, as saúvas acompanham a perfuradora, quando retirada, subindo pelo canal perfurado, até a superfície do solo. Isso sempre permite localizar, nos vários saúveiros, a zona de panelas habitadas, sem o disperdício de tempo e de mão de obra das grandes excavações.

Descrevemos a seguir a mudança completa efetuada para o ponto mais longínquo que foi possivel observar em nosso campo. Para maior clareza, organisamos o mapa (Fig. 4) que abrange, alem do campo propriamente dito, toda a área ocupada pelo saúveiro em questão, onde estão assinalados os pontos importantes para a boa compreensão do fato.

O ponto de penetração da içá para a fundação deste saúveiro é representado pela letra "A". Os primeiros olheiros foram abertos em volta do ponto A. Após o segundo ano de vida, êsse saúveiro, já bastante desenvolvido, mudou-se para a zona "B". Os olheiros espalharam-se para todos os lados, alcançando, os mais distanciados, os pontos "C", "D", "E" e "F". Tais olheiros correspondiam a canais de coleta de material, continuando, portanto, o centro do saúveiro a permanecer no ponto B. Nota-se que os pontos C, D, E e F acham-se muito perto da cerca que separa o nosso campo da avenida Ibirapuera, a qual é de concreto, e aberta ao trânsito público. Passado algum tempo, nos pontos H e I, portanto do outro lado da citada avenida, notamos que vários olheiros haviam sido abertos e estavam em franca atividade. Viam-se carreiros de formigas, carregadas de folhas, penetrando por esses novos canais. A princípio pensamos na possibilidade de algum saúveiro novo, que houvesse escapado ao nosso controle; entretanto, depois de minucioso exame em toda a área compreendida entre as construções "BI" e "CO", e mesmo alem, (assinaladas no mapa), verificamos que os olheiros eram esparsos e não havia sinais de saúveiros na sua visinhança. Estavamos pois quasi certos de que as formigas do formigueiro da zona B haviam prolongado os canais dos pontos C, D, E e F até a zona H e I, passando por baixo da avenida Ibirapuera. Para esclarecer esta questão abrimos uma valeta de cerca de dois metros de profundidade, um pouco adiante e paralelamente aos pontos C, D, E e F, conforme pode ser visto no mapa (valeta). No ponto "G" da valeta, a um metro e sessenta e cinco centimetros de profundidade, encontramos um canal de 15 cms. de largura por 10 cms. de altura, frequentado por grande número de formigas. Conforme pudemos verificar no dia seguinte à descoberta do canal G,— quando as formigas não mais agitadas pela nossa excavação, haviam retomado o ritmo normal de seus trabalhos, tratava-se de um grande canal por onde as formigas passavam em número consideravel. O canal ficou portanto interrompido pela valeta, mas as formigas continuaram a transitar, permitindo-nos vigiar toda sua atividade. Observamos grande movimento de formigas que formavam como que faixa escura de cerca de 20 cms. de largura. O trânsito das formigas era orientado em dois sentidos, em vai-e-vem.

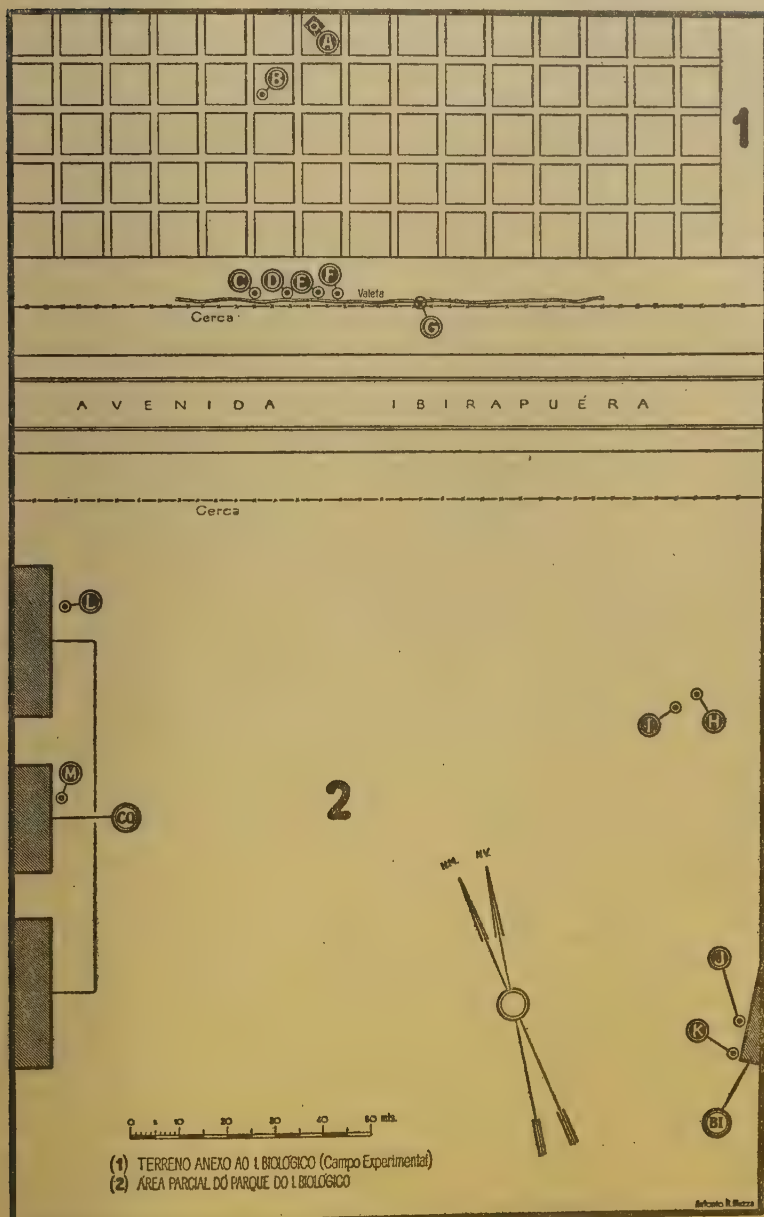


Fig. 4 - Mudança de saúveiro

Esperavamos observar a passagem de formigas carregando folhas provindas dos pontos H e I, mas, com surpresa nossa, isso não se deu. Nenhuma formiga carregada de folhas passava pela valeta. Nova surpresa quando, decorridos mais de dois dias, verificamos que a população estava atravessando a valeta e dirigindo-se, sempre pelo canal acima descrito, para os pontos H e I. Todas as formigas carregavam entre as mandíbulas formas jovens (ovos, larvas, prepupas e pupas) ou pedaços de "esponja" de fungo, sendo este último em menor quantidade. Estavamos assistindo, pois, a uma mudança completa do saúveiro. Esta, durou 15 dias ininterruptos, mantendo-se o carreiro em grande atividade durante tal período. Aos poucos, o número de formigas foi diminuindo, até que cessou completamente à atividade e nunca mais vimos saúvas atravessarem a valeta.

Nos olheiros localizados nas zonas B, C, D e F o trabalho cessou completamente; alguns dos canais foram ocupados por certas aranhas, e outros invadidos por formigas do gênero *Solenopsis*. O saúveiro na sua zona inicial que até dias atrás estivera em plena atividade, paralizou-se inteiramente. Várias explorações com a perfuradora JP foram feitas e nenhum sinal de vida foi obtido.

Êsse fato parece explicar certos casos em que se atribue a outras formigas a destruição de saúveiros.

Nos pontos H e I o número de olheiros aumentou rapidamente e dentro de alguns meses já se notava a elevação de terra solta e o aglomerado de olheiros característicos dos saúveiros normais.

Fazendo centro nos pontos H e I, os canais começaram a se extender e abrir-se em olheiros nos pontos J, K, L e M, perto das construções assinaladas no mapa (Fig. 4), pelas letras BI e CO. E' curioso notar que nos pontos BI (Biotério) e CO (Cocheiras) as formigas encontravam com facilidade restos de alimentos (milho principalmente) destinado aos animais ali recolhidos.

XII — OCUPAÇÃO DE SAÚVEIROS ABANDONADOS

Quando um saúveiro muda, as instalações abandonadas podem ser ocupadas por outra colônia de saúvas.

Em nosso campo experimental tivemos ocasião de observar e documentar bem esse fenômeno. A zona de panelas "vivas" do saúveiro, cuja mudança foi acima descrita e ilustrada pelo mapa (Fig. 4) foi ocupada, passados cerca de 8 meses, por outro saúveiro. E' preciso notar que durante esse periodo de 8 meses, na zona B não foi notado externa ou internamente nenhum movimento de saúvas e nenhum indício de vida, apesar de várias explorações feitas. O saúveiro que tomou conta da zona B (a primeira zona de panelas ativas do saúveiro

que mudara) ampliou-a e, até a presente data, acha-se ali localizado, ficando, depois de feita a mudança, completamente abandonada a sua própria zona de panelas.

Ha anos, durante o serviço de extinção de saúveiros no interior do Estado de São Paulo, nossa atenção vinha sendo chamada para um fato cuja explicação não conhecíamos. Trata-se do seguinte: por várias vezes, saúveiros que haviam sido muito bem combatidos e que durante vários meses não mais haviam dado sinais de vida, entravam repentinamente em franca atividade, de um dia para outro, com todos os característicos de formigueiros vivos, isto é, de saúveiros que nunca haviam sofrido combate. A única explicação então possivel era a sobrevivência do saúveiro depois do ataque, que com certeza teria sido mal feito. Essa explicação, entretanto, nunca nos satisfizera, porque a experiência nos havia demonstrado, inúmeras vezes, que saúveiros mal combatidos, apresentam logo alguns dias depois, alguns olheiros trabalhando, e aos poucos vai retomando a sua atividade normal. Hoje, após nossas observações, tal dúvida parece esclarecida, tendo a mesma impressão outras pessoas interessadas no combate à saúva, como por exemplo o Snr. José Vaz Pupo Nogueira, que teve ocasião de observar o seguinte fato: em campo onde haviam sido combatidos diversos formigueiros, ao passo que alguns foram deixados intactos a várias centenas de metros de distância dos primeiros, verificou-se o abandono de vários destes, cujas populações foram ocupar, após poucos meses de intervalo, saúveiros mortos.

Quanto às razões que impelem as saúvas a mudar de ninho, várias hipóteses, por enquanto, podem ser aventadas. Estamos inclinados a atribuir o fenômeno a resquícios de nomadismo, evidente em outros grupos de formigas e ainda manifestado nas saúvas, apesar destas se acharem filogenéticamente bem mais elevadas que as nômades propriamente ditas. Não se deve, contudo, deixar de considerar a possibilidade de uma necessidade que tenham, as formigas de procurar outra localização que lhes garanta ambiente ótimo para o "jardim" do cogumelo. Neste caso a multiplicação de algum microorganismo nas panelas com "jardim" de cogumelo poderia ser a causa da mudança, mesmo porque a ocupação do novo saúveiro sempre se dá depois de um lapso de tempo relativamente grande.

Devo especiais agradecimentos aos Srs.: A. Federman e B. Mazza pelas fotografias; A. Mazza, pela confecção dos gráficos, mapas e desenhos; J. Marcilio Junior, pelo levantamento topográfico e elaboração das plantas dos vários saúveiros estudados; M. Carvalho Leite,

por diversos e valiosos auxílios, e R. L. Araujo por sugestões prestadas na revisão do manuscrito.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE "SAÚVA"
(ATTA SPP. — HYMENOPTERA-FORMICIDAE)
I — EVOLUTION OF THE "SAÚVEIRO" (SAUVA-NEST)
(ATTA SEXDENS RUBROPILOSA FOREL, 1908)

Abstract

In the present paper the entire development of the "Saúveiro" from the digging of the ground by the "Içá" ("queen") to the liberation of the new fertile forms, is studied for the first time.

The method which enabled the author to study a considerable number of incipient nests, in an experimental field, is explained. From the experiments and observations the following was verified:

1) *The average number of days required for the opening of the first "olheiro" (entrance) was 87.2. This average was obtained from data secured during 1936, 1937, 1938, 1939 and 1940; the mean number of days being 84.8; 93.9; 72.0; 80.0 and 80.4 respectively; a minimum of 71 days and a maximum of 118 having been obtained.*

2) *The percentage of 12.6 was found for the "Içás" which survived in the experimental field, that is to say, only 213 out of 1.837 "Içás" managed to establish their colonies. This number, however, does not represent a true percentage, since the method of placing the "Içás" on the field eliminated important factors of destruction especially represented by their natural enemies.*

3) *After the "Revoada" (nuptial flight) all of the "Içás" were found to carry the pellets of hyphae. Most of these pellets were noted to be of different coloration and consistence; only a few of them being apparently viable. The technic contrived to examine a lot of 400 "Içás", in the search for the fungus pellet, is described.*

4) *The average number of days necessary to the opening of the second "olheiro" is 421.1. The first ten "olheiros" (the second included) appear within 503.1 days, with a minimum of 443 and a maximum of 561.*

5) *The first "revoada" takes place after 38 months, as verified by observing the complete development of three "saúveiros".*

6) *The various castes of workers, appear outside the "saúveiro" from the 4th to the 10th month. The "soldiers" are seen only 22 months after the foundation of the nest.*

7) *The number of "olheiros" in three "saúveiros" was 63, 113 and 53, after 24 months. 14 months later these numbers were 853, 984 and 1.071 respectively.*

8) *The development of three "saúveiros" could be represented, in a graph, by a fairly regular curve (Fig. 2).*

9) *Not all the "olheiros" are constantly in use by the "saúvas". In five different counts, in the same "saúveiro", data were obtained that confirm this statement. (Table 10).*

10) *The maximum number of "olheiros" is apparently reached at the time of the "revoada".*

11) *The "revoada" may be divided into two different phases, called respectively "Prerrevoada" and "Revoada". The characteristics of both phases are described.*

12) *The population of the "saúveiros" move to places distant from the primitive nest. One of these changes of nests was observed, a description of it being given.*

13) *The nests of Atta sexdens rubropilosa* Forel, *abandoned by their populations, are frequently taken up by other colonies of the same species.*

The "saúveiros" in which the "revoada" took place are designated as "adults".

Several laboratory experiments and field observations are recorded in which the aggressiveness of the "saúvas" is demonstrated. The author had two opportunities of witnessing "wars" between ants from two different nests of the same species.

BIBLIOGRAFIA

Autuori, M. — 1937 — Contribuição para a biologia da formiga "saúva". (Atta spp). Plano de trabalho e observações preliminares. *O Biológico,* São Paulo, Brasil, 3, 286-288.

Autuori, M. — 1940 — Algumas observações sobre formigas cultivadoras de fungo. (Hym.-Formicidae) *Revista de Entomologia,* Rio de Janeiro, Brasil, 11, 215-226.

Autuori, M. — 1940a — Um novo processo de combate à saúva. *O Biologico,* São Paulo, Brasil, 4, 270-272.

Borgmeier, Th. — 1939 — Nova contribuição para o conhecimento das formigas neotropicas. *Revista de Entomologia,* Rio de Janeiro, Brasil, 10, 403-428.

Eidmann, H. — 1935 — Zur Kenntnis der Blattschneiderameise Atta sexdens L. insbesondere ihrer Oekologie. *Zs. angew. Ent.,* Berlim, 22.

Huber, J. — 1908 — A origem das colonias de Saúba (Atta sexdens) *Bol. Museu Goeldi,* Pará, 1, 223-241.

JABOBY, M. — 1937 — Das räumliche Wachsen des Atta-Nestes vom 50. bis zum 90 Tage. (Hym.-Formicidae). *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, Brasil, 7, 416-425.

SAMPAIO DE AZEVEDO, A. G. — 1894 — *Saúva ou Manhú-uára.* Monographia. Typ. Diario Official, São Paulo, Brasil, 74 pp.

STAHEL & GEIJSKES — 1939 — Ueber den Nestbau von Atta cephalotes L. und Atta sexdens L. (Hym.-Formicidae). *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro, Brasil, 10, 27-78.

WHEELER, W. M. — 1926 — *Ants, their structure, development and behavior.* Nova York. Columbia Univ. Press. 663 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 45

Fig. *A* — Vista parcial do campo experimental destinado ao estudo da formiga saúva. (A. Federman fot.).

Fig. *B* — O primeiro olheiro de um saúveiro (A. Federman fot.).

Estampa 46

Fig. *C* — Vista parcial de um saúveiro, no campo experimental, mostrando parte dos olheiros marcados por meio de estacas numeradas. (B. Mazza fot.).

Fig. *D* — Olheiro de saúveiro na época da prerrevoada. (A. Federman fot.).

Estampa 47

Fig. *E* — Formas aladas prontas para a revoada (B. Mazza fot.).

Fig. *F* — Vista geral de um saúveiro mostrando as formas aladas prontas para a revoada (B. Mazza fot.).

Estampa 48

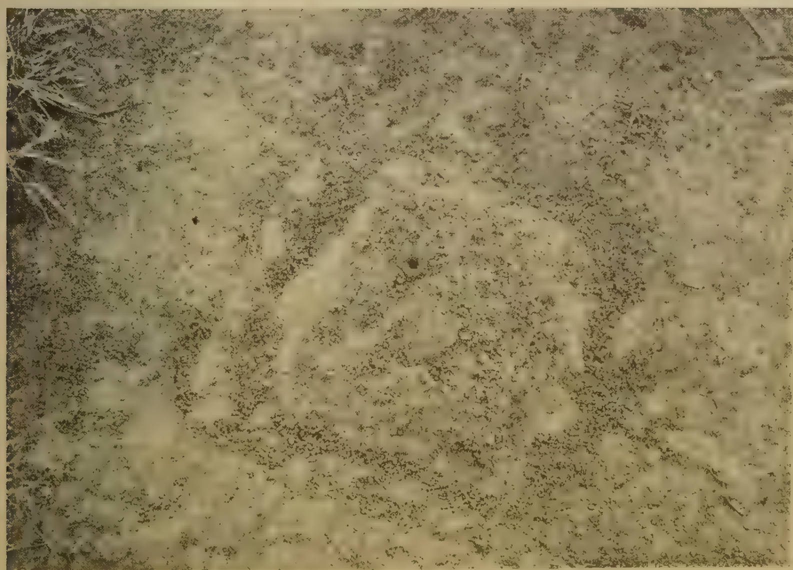
Fig. *G* — Saúveiros cultivados em laboratório (A. Federman fot.).

Fig. *H* — Saúvas mortas após uma luta entre dois saúveiros da mesma espécie (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL) (A. Mazza fot.).

——o——



A



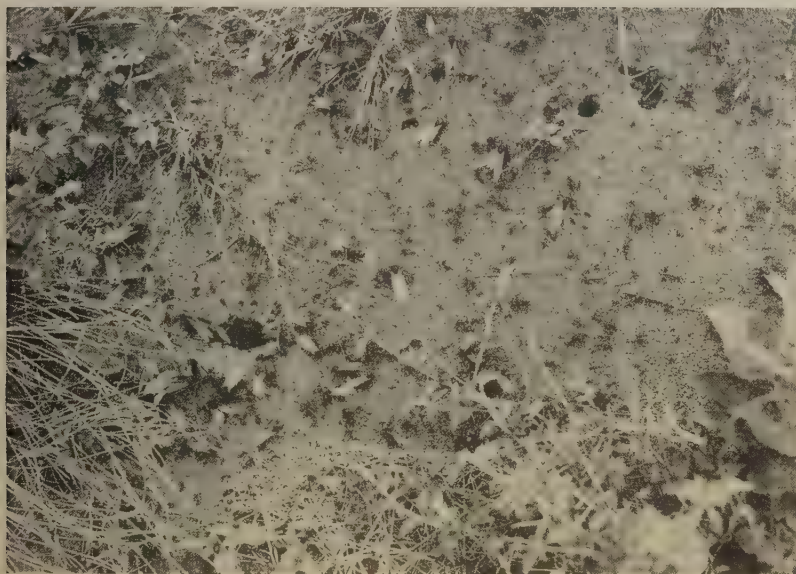
B



C



D

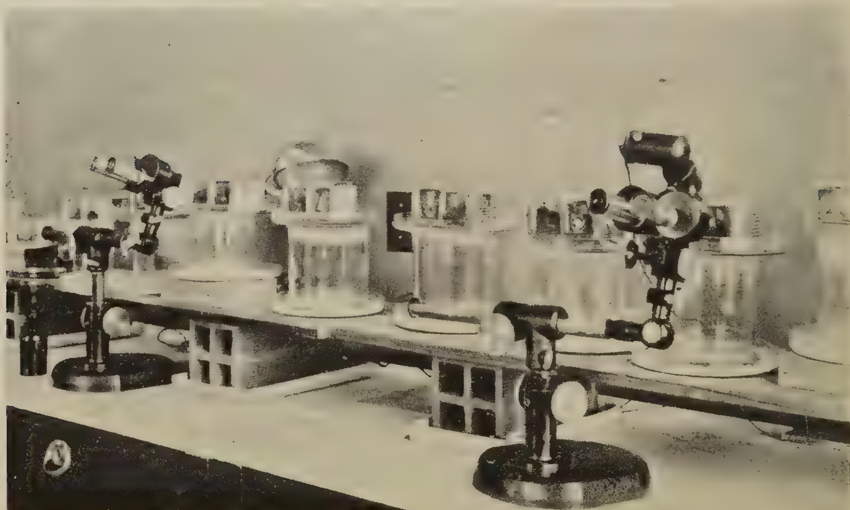


E

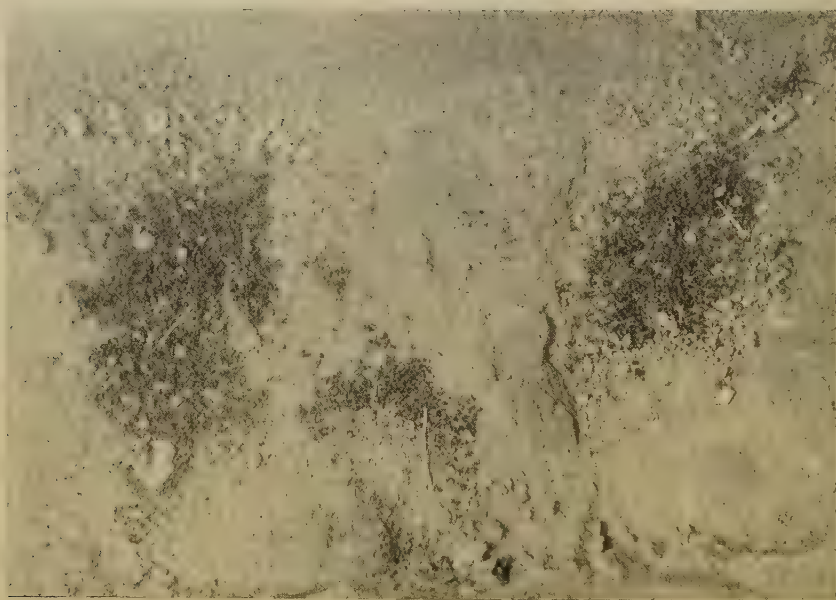


F

Estampa 48



G



H

Vol. 12 — Art. 16 Novembro de 1941

EXPRESSÃO MATEMATICA DO CRESCIMENTO DE FORMIGUEIROS DE "ATTA SEXDENS RUBROPILOSA" REPRESENTADO PELO AUMENTO DO NUMERO DE OLHEIROS

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

A regularidade do aumento do número de olheiros apresentada nas observações de M. AUTUORI, no trabalho anterior destes Arquivos (1) sugere que esse aumento se processa segundo uma lei natural. Essa lei, a julgar pela forma geral do gráfico representando o número de olheiros mensais para os formigueiros 36, 42 e 80F (*loc. cit.* fig. 2) deve ser a de um fenomeno autocatacinético, a qual se apresenta frequentemente nos problemas relativos ao crescimento de individuos (curva de Robertson) ou de populações de individuos em ambiente limitado (2).

Baseado nessa hipotese, calculei, a partir da serie formada com o número mensal total medio de olheiros dos tres formigueiros, a equação:

$$N = \frac{1000}{271737\, e^{-0,42\, t} + 1}$$

onde N é o número mensal total medio de olheiros, e a base dos logaritmos neperianos, e t o número de mêses a partir do inicio dos formigueiros.

Essa equação fornece, quando t é substituido pela serie dos números inteiros, 1, 2, 3, etc., uma serie que representa satisfatoriamente a serie de observações obtida por M. AUTUORI, conforme se pode ver na tabela 1 (colunas 3, 4 e 5) e está representado no gráfico da figura 1. Na mesma tabela figura o aumento mensal do número de olheiros observados (coluna 6) e calculado (coluna 7), obtido por substração, mês a mês, das series das colunas 4 e 5. Os dados das colunas 6 e 7 foram representados no gráfico da figura 2.

A equação empregada, como dissemos acima, é a do crescimento de uma população de individuos em ambiente limitado, pelo que podemos concluir que ela representa, na realidade, o crescimento da po-

---

(1) M. Autuori. Contribuição para o conhecimento da saúva (Atta spp. — Hymen. Formicidae). I — Evolução do saúveiro. (Atta sexdens rubropilosa FOREL, 1908) *Arq. Inst. Biol.* 12: 197-228, 1941.
(2) Feldman, W. M. Biomathematics. 2.ª ed. Londres, 1935. pp. 334-335 e 362-364.

TABELA 1

Número total mensal medio e acréscimo mensal medio de olheiros dos formigueiros n.os 36, 42 e 80F observados e calculados a partir da equação

$$N = \frac{1000}{271737\ e^{-0,42\ t} + 1}$$

Mês	Ano	Numero de mêses t	Numero total mensal medio de olheiros		Acrescimo mensal medio de olheiros	
			Observado	Calculado	Observado	Calculado
Fevereiro	1938	4	1	0,019	—	—
Outubro	1938	12	1	0,57	—	—
Novembro	»	13	1	0,86	—	0,29
Dezembro	»	14	1	1,32	—	0,46
Janeiro	1939	15	1,33	2,00	0,33	0,68
Fevereiro	»	16	1,67	3,04	0,34	1,04
Março	»	17	2,67	4,62	1,00	1,58
Abril	»	18	4,33	7,01	1,67	2,39
Maio	»	19	7,33	10,64	3,00	3,63
Junho	»	20	19,33	16,10	12,00	5,46
Julho	»	21	34,33	24,30	15,00	8,20
Agosto	»	22	45,00	36,52	10,67	12,22
Setembro	»	23	58,67	54,55	13,67	18,03
Outubro	»	24	76,33	80,71	17,67	26,16
Novembro	»	25	115,67	117,89	39,33	37,18
Dezembro	»	26	150,33	168,99	34,67	51,10
Janeiro	1940	27	243,00	236,35	92,67	67,36
Fevereiro	»	28	306,00	320,24	63,00	83,89
Março	»	29	397,67	417,60	91,67	97,36
Abril	»	30	523,00	521,78	125,33	104,18
Maio	»	31	587,00	624,14	64,00	102,36
Junho	»	32	721,33	716,53	134,33	92,39
Julho	»	33	813,67	793,65	92,33	77,12
Agosto	»	34	841,33	854,10	27,67	60,45
Setembro	»	35	873,33	899,12	32,00	45,02
Outubro	»	36	926,67	931,32	53,33	32,20
Novembro	»	37	955,67	953,78	29,00	22,46
Dezembro	»	38	969,33	969,10	13,67	15,32
Janeiro	1941	39	994,67	979,50	25,33	10,40
Fevereiro	»	40	—	986,44	—	6,94
Março	»	41	—	991,06	—	4,62
∞	—	—	—	1000	—	0

pulação do formigueiro, e que o número de olheiros é, portanto, proporcional a essa população.

Admitida essa hipotese, podemos fazer as seguintes deduções:

1.º — O aumento da população do formigueiro, representado pelo gráfico da figura 2, é a principio lento, acelerando-se em seguida, para alcançar o seu máximo, aproximadamente 30 mêses após o inicio

do formigueiro. Finalmente ele declina, de forma que a população tende para um máximo que teóricamente sómente seria alcançado num tempo infinito, mas que praticamente já está bem perto de ser alcançado depois de 40 mêses, conforme se vê no gráfico da figura 1.

Este resultado dá um sentido preciso à noção de "formigueiro adulto" a que se refere M. AUTUORI e à de "superorganismo", que compara o formigueiro a um individuo ou organismo. O formigueiro

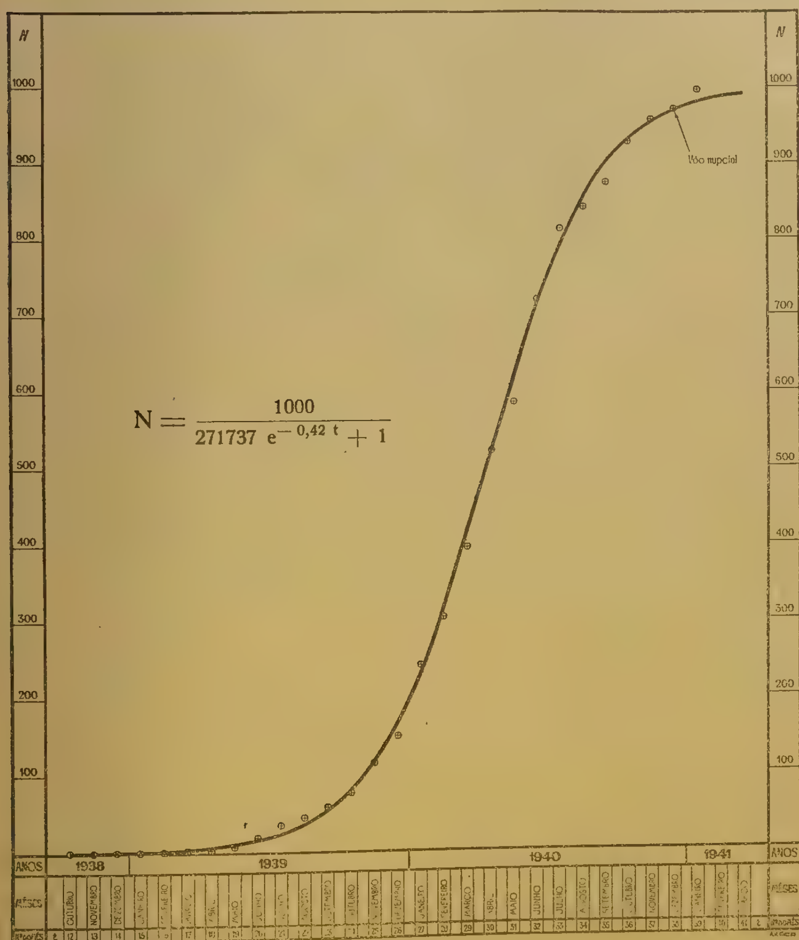


Fig. 1 — Número total medio mensal de olheiros de tres formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (pequenos círculos) e curva teórica calculada a partir desse número (traço cheio).

é "adulto" quando se aproxima do máximo a que acima nos referimos. E' interessante, e provavelmente significativo, que essa "maturidade morfológica" coincida justamente com a "maturidade sexual" do formigueiro, ocorrendo pois, no "superorganismo", o mesmo que no organismo individual. De fato, o vôo nupcial, nos três formigueiros em apreço, deu-se 38 mêses após o inicio deles, isto é, quando se estavam aproximando do estado adulto.

2.º — O valor de N, no 4.º mês, ou seja, na abertura do primeiro olheiro, é de 0,0198, ao passo que para t igual ao infinito, ele é de 1000. Conclue-se que a população do formigueiro adulto é aproximadamente 50.000 vezes maior que a de quando se abriu o primeiro olheiro. Conhecendo-se esta, seria possivel calcular a população final, e esse cálculo seria passivel de uma verificação prática. Para faze-la, entretanto, seria indispensavel levar em conta as dimensões, muito diferentes, das diversas castas de formigas.

3.º — A equação é, como dissemos, a do crescimento de uma população em ambiente limitado. Esse ambiente limitado, no caso do formigueiro, é constituido pela "área de abastecimento", cujos limites são determinados pelo percurso máximo que a formiga pode cobrir em procura do material vegetal necessario à formação de seus canteiros de fungo. Compreende-se que esse percurso não deve ultrapassar certos limites, porquanto deve existir certa relação entre o tempo que a formiga dedica à colheita do material e o consagrado a seu transporte até o formigueiro. Sendo muito longo o caminho a percorrer, seria insuficiente o tempo consagrado à colheita, no caso da mesma formiga se dedicar aos dois trabalhos, ou insuficiente o número de formigas dedicadas à colheita em relação ao de formigas ocupadas no transporte, no caso de uma especialização no trabalho.

As dimensões finais do formigueiro estão em relação com a "densidade de material vegetal" dentro da "area de abastecimento". Quanto maior essa densidade, mais facil para as formigas preparar os seus canteiros de fungo. O número final aproximado, de 1000 olheiros, encontrado nas experiencias de M. AUTUORI, poderia pois ter sido outro numa localidade diferente, que tivesse outra densidade de material vegetal. Da mesma forma, compreende-se que as dimensões gerais do formigueiro podem ser alteradas pelas flutuações da vegetação.

4.º — Examinando-se o gráfico da figura 2, constata-se que existe uma periodicidade bastante regular, aproximadamente de um a dois mêses, do número observado de olheiros aparecidos mensalmente, em relação ao número calculado. Essa periodicidade poderia

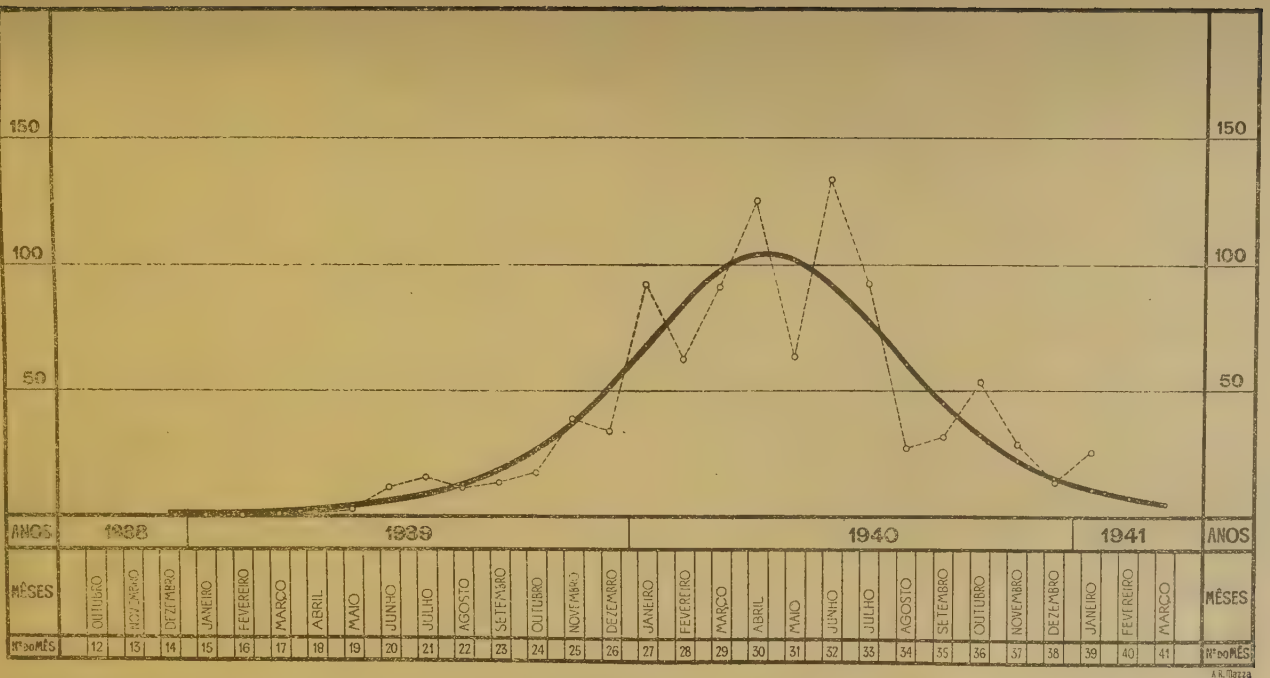


Fig. 2 — Aumento mensal medio dos olheiros de tres formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (pequenos círculos) e curva teórica estabelecida a partir da curva da figura 1 (traço cheio).

ser atribuida às variações do clima, e mais especialmente, da precipitação atmosférica, quer por ação diréta sobre a atividade da formiga ou sobre a sua cultura de fungo, quer indirétamente, por sua influencia na densidade do material vegetal. Nenhuma relação dessa natureza, entretanto, foi possivel estabelecer. Uma observação de M. AUTUORI (*loc. cit.*) sugere uma outra explicação. M. AUTUORI verificou que a atividade das formigas, ao longo dos carreiros e nas plantas que lhes fornecem o material vegetal para suas culturas de fungo, não é constante. Observou periodos de intensa atividade alternando com periodos em que as formigas só eram encontradas fóra dos formigueiros em número reduzido. Da periodicidade no aparecimento de novos olheiros e dessa observação de M. AUTUORI, pode-se inferir que a atividade da formiga é dedicada alternadamente à construção de panelas, canais e olheiros, e à preparação e extensão de seus canteiros de fungo.

5.º — Si, de acôrdo com a nossa hipotese, o crescimento do formigueiro é realmente um fenómeno autocatacinético, a curva do seu crescimento é idêntica à de outras populações em que todos os individuos, e não sómente um só, como no caso do formigueiro, participam da procriação. Nessas condições a postura da içá ou rainha deve fazer-se segundo uma lei bem diferente da de outros animais pôedores, como por exemplo a galinha. Sabe-se que a produção de ovos na galinha decresce com a idade. Na rainha do formigueiro a oviposição achar-se-ia representada pela curva do gráfico da figura 2 que exprime o aumento da população do formigueiro, de acôrdo com nossa hipotese inicial. Vê-se que o número de ovos aumenta progressivamente até alcançar um máximo, decrescendo a seguir, o que se pode atribuir ao esgotamento dos ovários, exatamente como ocorre com a galinha desde o inicio da postura.

Essa conclusão a que conduz a nossa hipotese podia ser prevista como uma necessidade decorrente do fato das larvas do formigueiro serem cuidadas pelas obreiras e não, — salvo nos primeiros dias da vida do formigueiro, — pela içá. E' evidente que a lei de produção dos ovos pela içá não poderia ser idêntica à da galinha, que cuida sempre da propria prole. Conclue-se pois que a rainha deve pôr um número de ovos correspondente ao número de obreiras, e que, portanto, pelo menos durante os primeiros mêses, a postura vai crescendo com a população do formigueiro.

MATHEMATICAL EXPRESSION OF THE GROWTH OF THE NEST OF "ATTA SEXDENS RUBROPILOSA" AS SHOWN BY THE INCREASE IN THE NUMBER OF OPENINGS

Abstract

From the data obtained by M. Autuori in his experiment on the development of nests of Atta sexdens rubropilosa, the author calculated the equation

$$N = \frac{1000}{271737\ e^{-0{,}42\,t} + 1}$$

which represents satisfactorily the average monthly total of openings or "craters" in the three nests 36, 42 and 80F. The equation is that usually found for the growth of populations within a limited space and should therefore represent the growth of the population of the ant nest, to which the number of craters is accordingly roughly proportional.

The equation gives a precise meaning to the notions of "adult nest" and "superorganism" and it is emphasized that the adult stage, reached when the nest approches its maximum size with a total of 1000 craters coincides with "sexual maturity", revealed by the "nuptial flight".

The equation also shows that the population of the adult nest is approximately 50.000 larger than at the time of the opening of the first crater.

The "limited space", required by the equation, is the "area of purveyance", around the nest, the limit of which is the maximum distance the ant is able to cover in its search for vegetable material for the fungous garden, without exceeding the maximum ratio between its activity in searching for the material and the activity in building and maintaining the nest. The ultimate size of the nest depends on the "density of vegetable material" available to the ant within the "area of purveyance".

The monthly increase in the number of openings exhibits a periodicity of approximately one to two months. Since M. Autuori observed that there is also a periodicity in the activities of the ants in gathering leaves for their fungous gardens, it is reasonable to suppose that the activity of the ants is alternately devoted to the gathering of the leaves and development of the fungous gardens, and to the building of new chambers and craters.

The monthly increase in the number of openings and accordingly, of the population, is proportional to the oviposition by the queen.

This oviposition is, therefore, different from that of the hen and other egg-laying animals. While oviposition in the latter decreases with age, in the queen of A t t a *spp. it increases until it reaches a maximum and decreases afterwards. Therefore during the first months of the life of the nest, the number of eggs laid by the queen increases with the population. Inasmuch as the queen does not tend her own brood, which is done by the other ants of the nest, this fact provides for the necessary proportion between the number of larvae and the number of ants that can tend then.*



Vol. 12 — Art. 17 Novembro de 1941

NOTAS SOBRE UMA COLEÇÃO DE FUNGOS DO BRASIL MERIDIONAL

POR

C. G. Hansford

Do Departamento de Agricultura, Uganda-Africa

Com 6 figuras no texto

A presente coleção de *Meliolineae* e fungos visinhos, reunida durante os dez últimos anos no herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico, foi enviada ao autor para determinação, a vista de seus recentes trabalhos sobre este grupo de fungos. Nela foram incluidos alguns especimens do mesmo grupo anteriormente classificados por outros micologistas (J. A. STEVENSON, J. RICK) e confirmados agora pelo presente autor. Os hospedeiros foram na sua maioria classificados por F. C. HOEHNE, J. F. TOLEDO e A. GEHRT. A essas pessoas, assim como a A. A. BITANCOURT, que se encarregou da tradução para o português, consignamos aqui os nossos agradecimentos. Os números indicados são os do citado herbario:

N.º 102 *Irenina Laguncularíae* (EARLE) STEVENS (Ann. Myc. 25:458, 1927).
Sin.: *Meliola Laguncularíae* EARLE
Irene Laguncularíae (EARLE) TORO
Amazonia Laguncularíae (EARLE) RYAN
Sobre *Laguncularia racemosa* (R.) GAERTN., Santos, São Paulo, Ag. 1931, J. DESLANDES.

N.º 236 *Meliola Psidii* FR. (Linnaea, 5:549. 1830)
Sobre *Psidium guajava* L., Caraguatatuba, São Paulo, Nov. 1931, J. DESLANDES.

N.º 1579 *Meliola malacotricha* SPEG. (Ann. Soc. Cient. Arg. 26: n.º 59. 1888).
Sin.: *Meliola Ipomoeae* EARLE
M. Merremiae REHM
M. Hewittiae REHM
M. Ipomoeae REHM
Sobre *Dichondra repens* FORST., Cantareira, S. Paulo, 19-3-41, R. DRUMMOND GONÇALVES 53.

N.º 1634 *Meliola* sp. indet. Especimen esteril, sem esporos ou peritecios.

Sobre *Rhyncospora exaltata* KUNTH., São Paulo, São Paulo, Set. 1934. A. GEHRT.

N.º 2890 *Englerulella Davillae* HANSFORD (Journ. Linn. Soc., no prelo).

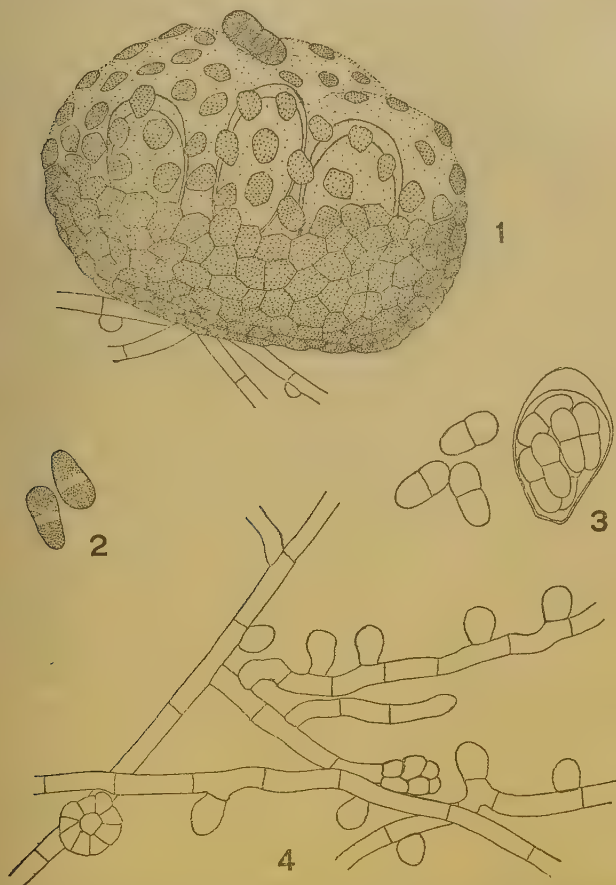
O genero *Englerulella* HANSF. (*loc. cit.*) é assim descrito:

Parasitas das folhas. Micelio superficial marron, munido de hifopodios, reticulado, anastomosado, sem setas. Peritecios superficiais, globosos, glabros, de côr marron, difluentes, formando um muco, na parte superior, quando maduros. Ascos elípticos, sesseis, sem parafisas, contendo 8 esporos. Esporos de côr marron, munidos de um septo. Conidias formadas em picnidios mucosos, escuras, continuas (*Oothecium* PETR.).

Este genero difere de *Schiffnerula* pela forma imperfeita, e de *Englerula* pela presença de hifopodios.

E. Davillae forma colonias de côr preta, arredondadas, epífilas, e que chegam até 5 mm. de diametro. O micelio consiste em hifas de côr marron escura, com diametro aproximadamente de 5 µ, septadas, com células medindo 15 a 30 µ de comprimento, retas ou flexuosas, irregularmente ramificadas e que se anastomosam em um retículo denso. Hifopodios alternados ou unilaterais, continuos, ligeiramente mais escuros do que as hifas onde se formam, irregularmente hemisféricos, até subclavados, 8-15 x 8-10 µ. Sem setas micelianas. Picnidios e peritecios oriundos da parte superior, livre, das hifas micelianas, na forma de um grupo sessil de células; nunca, aparentemente, de uma célula pedicelada única como em *Balladyna* e generos afins. O grupo de células iniciais divide-se para formar uma esfera ôca, de parenquima poligonal, marron escuro, liso, glabro, feito de células que medem aproximadamente 8 µ de diametro; parede feita de uma só camada, com espessura de 5 µ, mais ou menos; picnidios maduros, medindo até 60 µ de diametros; peritecios, até 100 µ. Os picnidios abrem-se irregularmente no ápice, descobrindo as conidias soltas, formadas na parte interna; essas conidias são do tipo *Oothecium,* marron escuras, continuas, mais ou menos piriformes, lisas, com uma faixa mediana hialina, medindo 14-18 x 6-8 µ. A formação das conidias parece continuar depois da abertura do picnidio e da separação das células das paredes dele, por um muco consistente. Os peritecios são astomos, com paredes feitas de uma única camada de células, como os picnidios, glabros, marron escuros, lisos. As células superiores das paredes separam-se e boiam sobre a massa globular de uma geleia produzida no interior do peritecio; nessa geleia desenvolvem-se, na base do peritecio, numerosos ascos, formando um fasciculo. Ascos numerosos, oval-elíp-

ticos, sem parafisas, arredondados e espessos na parte superior, que mede 7 μ de espessura, sesseis, contendo 8 esporos, aproximadamente de 50 μ de comprimento por 20-30 μ de diametro. Esporos marrons, oblongos, munidos de um septo, lisos, ligeiramente constritos, com cé-



Englerulella Davillae HANSFORD: Fig. 1 - vista lateral de um peritecio; fig. 2 - duas conidias; fig. 3 - asco e ascosporos; fig. 4 - vista superficial do micelio e dos hifopodios, com rudimentos de peritecios em formação.

lulas ligeiramente desiguais, mais ou menos de 18 x 8 μ. Os hifopodios produzem haustorias simples, pequenas, reniformes, na epiderme do hospedeiro, semelhantes ás de muitas especies de *Asterina;* não ha micelio interno, nem penetração dos estomas.

Sobre *Davilla rugosa* POIR., Itaquera, São Paulo, 31-7-38, S. C. ARRUDA.

Nesse material, que é o tipo, a *Englerulella* se acha parasitada por uma especie de *Cicinnobella.*

N.º 2981 *Irenopsis tortuosa* (WINT.) STEVENS (Ann. Myc. 25:439. 1927).

Sin: *Meliola tortuosa* WINT.

Neste material, *Irenopsis* acha-se parasitada por *Eriomycopsis flagellata* HANSF. (Bothalia, no prelo), por *E. minima* HANSF, (*loc. cit.*) e por um Discomiceto cujo nome correto não podemos encontrar, mas que parece ter sido descrito varias vezes, como parasita de *Meliola* em muitas partes dos trópicos.

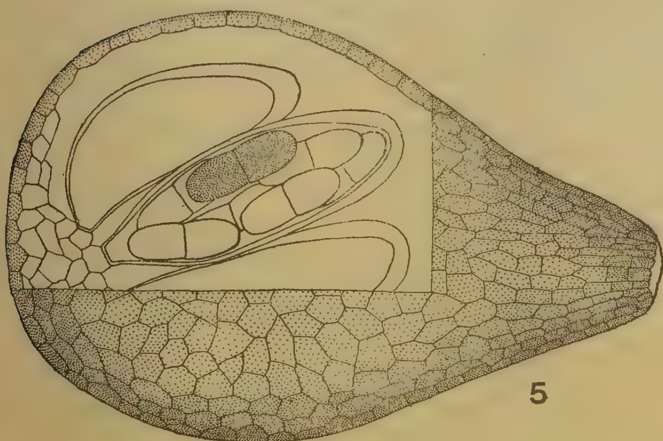
Na face inferior das folhas dessa coleção acha-se *Lizonia Piptocarphae* HANSF. (Journ. Lin. Soc., no prelo) cuja descrição é a seguinte:

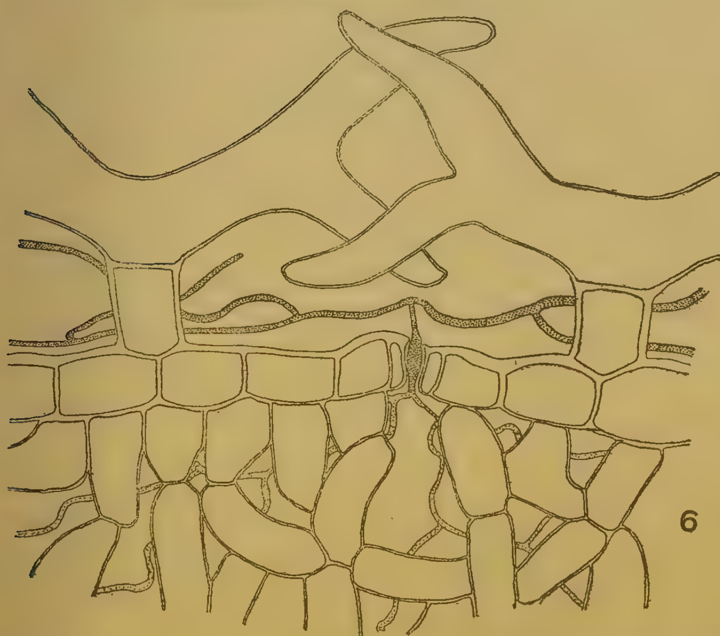
Micelio feito de hifas marron escuro, irregularmente ramificadas, indistintamente septadas, que se ramificam sobre a superficie da folha e por entre os pêlos foliares, com 3 µ de diametro, não torulosas e não formando uma colonia definida. O micelio interno penetra no mesofilo pelos estomas e é hialino, com 2 µ, mais ou menos de diametro, não formando estomopodios ou haustorias. Peritecios superficiais, sobre o micelio externo, espalhados por entre os pêlos foliares, pretos, ampuliformes, com ostiolo curto, conoide, 150-200 µ de altura por 120 µ, aproximadamente, de diametro, glabros, lisos; ostiolo munido de um poro terminal com 20 µ, mais ou menos, de diametro. Paredes do peritecio feitas de um parenquima poligonal de uma única camada de células, medindo 10 x 5-10 µ. Ascos sem parafisas, numerosos, amadurecendo sucessivamente e oriundos de um tecido plectenquimático hialino na base do peritecio, de onde se destacam como ramos laterais erectos. Ascos alongados, elípticos ou em forma de saco, sesseis ou levemente atenuados na base, largamente arredondados e espessos no ápice, onde a parede mede 7 µ, contendo 8 esporos, medindo até 80 x 30 µ. Esporos irregularmente distribuidos no asco, oblongos, marrons, lisos, munidos de um septo, não constritos ou apenas constritos no septo, com células subiguais, medindo 23-30 x 8-11 µ.

Sobre *Piptocarpha axillaris* (LISS.) BAKER, Itaquera, São Paulo, 31-7-38, S. C. ARRUDA.

N.º 2999 *Coleroa* sp. Pela estrutura, este especimen corresponde bem a *C. claviseta* (DOIDGE) HANSF. e a *C. cordiicola* (P. HENN.) HANSF, ambos originalmente descritos no gênero *Dimeriella,* agora porem transferidos a

Coleroa (Journ. Linn. Soc., no prélo). A determinação exata dessa especie não pode ser feita na ausencia do nome do hospedeiro.





Lizonia Piptocarphae HANSFORD: Fig. 5 - peritecio, com uma parte vista em secção; fig. 6 - secção transversal da parte inferior de uma folha, mostrando o micelio interno no mesofilo e o micelio superficial entre os pelos foliares.

Sobre *Dicotiledonea.* Cariacica, Espirito Santo, 15-7-38, S. GONÇALVES-SILVA.

N.º 3001 *Irenopsis* sp. (3401.4220), parasitado por *Dimerium venturioides* (SACC. & BERL.) THEISS. e por *D. pulveraceum* (SPEG.) THEISS.

Sobre *Dicotiledonea,* Cariacica, Espirito Santo, 15-7-38, S. GONÇALVES-SILVA.

N.º 3012 *Irenopsis bignoniacerum* STEVENS (Ann. Myc. 25:442. 1927).

Sobre *Pyrostegia venusta,* São Paulo, São Paulo, Setembro 1938, B. PICKEL.

Neste material os esporos medem até 45 μ de comprimento, correspondendo bem, entretanto, de outros pontos de vista, à descrição de STEVENS.

N.º 3312 *Meliola Rhois* P. HENN. var. *flexuosiseta* (SPEG.) n. comb.

Sin.: *Meliola polytricha* KALCHBR. & COOKE, var. *flexuosiseta* SPEG. (Rev. Mus. La Plata, 15:16. 1908).

Sobre *Schinus* sp. Santa Maria, R. Grande do Sul, 1936, J. RICK.

Não ha semelhança com o tipo de *M. polytricha,* ao passo que o presente material aproxima-se muito de *M. Rhois,* salvo no que diz respeito às setas, irregularmente flexuosas.

N.º 3315 *Irenina tomentosa* (WINT.) STEVENS (Ann. Myc. 25:462. 1927).

Sin.: *Meliola tomentosa* WINT.

Sobre uma *Solanacea* indeterminada, São Leopoldo, R. Grande do Sul. Nov. 1909. J. RICK.

NOTES ON A COLLECTION OF LEAF FUNGI FROM SOUTHERN BRAZIL

Abstract

The fungi mentioned here all occur on leaves of various plants of southern Brazil.

Englerulella Davillae belongs to a new genus of the hyphopodiate Perisporiaceae, having slimy-diffluent perithecia.

Lizonia Piptocarphae is a representative of a group of Sphaeriaceae which appears to be of common occurrence on tropical plants, having minute superficial perithecia scattered among the leaf hairs. This group is parasitic by means of an internal mycelium penetrating the stomata without developing special "stomopodia" as in Parodiopsis, and not producing haustoria in the host cells.

——o——

Vol. 12 — Art. 18 Novembro de 1941

A DOENÇA DE AUJESZKY EM SUINOS NO BRASIL, NOS FOCOS DE EPIZOOTIAS EM BOVINOS, — PELA PESQUISA DE ANTICORPOS NEUTRALISANTES DO VIRUS

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMARIO

As investigações realizadas neste ultimo decenio sobre a doença de Aujeszky, reunindo dados muito mais completos sobre a distribuição geográfica, mostraram de modo surpreendente que o virus aparece muito mais disseminado do que se supunha. Confirma-se a velha asserção, formulada em 1912 por CADEAC e PANISSET, ao escreverem que a doença é mais desconhecida do que realmente rara. Em numerosos paises da Europa, como em regiões da Asia, da Africa e dos Estados Unidos, focos de identificação mais recente foram surgindo, mostrando sempre que o virus ocasiona casos isolados, ou epizootias periodicas, em pontos diversos e distantes uns dos outros.

Constata-se no entanto que por toda parte os focos surgem sempre sob a forma de pequenos surtos localizados, sem tendencia invasora, que aparecem de modo subito, e desaparecem com a mesma rapidez com que surgiram. Verifica-se mesmo, com frequencia, que a identificação se faz através de simples casos isolados, ocorrentes no cão, ou em bovinos, como nos focos encontrados na França, no da Dinamarca, no da Turquia asiatica e da Tunisia. Geralmente a doença conserva

esta velha característica: nas especies mais sensiveis à infecção bem caracterisada e mortal, ela não surge sob forma de epizootias graves ou extensas.

Entre os velhos focos, só em um deles, o da Hungria, a doença é referida com frequencia ligeiramente mais elevada. As estatísticas classicas de MAREK registram, com efeito, series de casos anuais, no gato e no cão. Epizootias raras, senão rarissimas, são alem disso alí registradas no carneiro, nos bovinos e mais recentemente, bem estudadas no porco.

Entre os novos focos, dois devem ser retidos: o da Holanda, sob a forma de epizootias no porco, acompanhadas de casos isolados nas outras especies e o dos Estados Unidos, onde casos em pequenas series são registrados nos bovinos e onde a larga disseminação da infecção no porco foi demonstrada, pela pesquiza de anticorpos neutralisantes do virus.

Examinando pois, os dados dispersos que a literatura registra, relativos à distribuição geográfica da doença, é impressionante verificar a pequena extensão dos surtos epizooticos e o numero reduzido de casos ocorridos em bovinos. Confrontando êsses dados com os que temos reunido no foco brasileiro, verifica-se que é o Brasil, no momento, o maior foco da doença conhecido, dada a larga distribuição do virus, a frequencia dos surtos e o numero elevado de casos que ocorrem em bovinos. Somados todos os focos da doença no resto do mundo, o total é ainda menor que o de surtos epizooticos verificados só no Estado de S. Paulo, nesses ultimos cinco anos.

O foco brasileiro da doença de Aujeszky alcança uma vasta região do país: é constituido, em linhas gerais, pela região do Brasil central compreendendo quasi todo o Estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, desde Sapucaí-Mirim e Passa Quatro, passando por Varginha, até Uberaba e Prata; estende-se mesmo mais longe, a regiões mais distantes, de Minas Gerais, de Goiaz, do Espirito Santo, do Estado do Rio de Janeiro, e para o sul, a regiões do norte do Paraná, como Cambará e Sertanopolis.

Até o inicio dos nossos trabalhos, no entanto, depois da identificação da doença em nosso meio, feita por CARINI e MACIEL em 1912, as unicas amostras isoladas o foram por ALVES DE SOUZA, em uma epizootia no municipio do Pomba, em 1922 e por PATTO, 1932, em material recebido de Varginha, focos situados ambos em Minas Gerais.

Para se fixar uma rapida idéia da frequencia dos surtos epizooticos surgidos no Estado de S. Paulo, basta assinalar que até agora isolamos aqui, facilmente, 21 amostras de virus, procedentes de quasi todas as regiões; que registramos, com o concurso do Serviço de Defesa Sanitaria Animal do Instituto, mais de 60 focos, e que as epizootias em bovinos têm, não raro, um carater de gravidade que não é geralmente assinalado, com series de casos atingindo 10-15-20 bovinos

no espaço de alguns dias, em reduzidos efetivos de gado leiteiro, o que dá uma incidencia de 15 a 30%! Em nenhum outro foco conhecido a doença revela essa extensão nem essa gravidade.

A evidencia desses fatos indicava um interessante campo de trabalho, que reclamava um exame dos aspetos clinicos e epidemiológicos da doença, associado a um estudo de laboratorio, de modo a combinar dados de observação no campo, em condições naturais, com outros de experiencia, e tentar uma contribuição de resultados definitivos e praticos, que resolvendo questões ligadas à epidemiologia, trouxesse ao mesmo tempo e como consequência uma solução aplicada, visando a profilaxia e, nesta, especialmente, procurando cortar a fonte de infecção das epizootias em bovinos.

No concernente á vacinação, falharam todas as tentativas até agora realizadas com o fim de alcançar uma imunidade pelo emprego do virus inativado por agentes quimicos ou físicos. Assim aconteceu nos ensaios com o fenol, o éter, o cloroformio, etc., ou no caso do virus tratado pela dessecação, segundo o método pastoriano clássico de vacinação antirabica. Nessa direção, fizemos igualmente alguns ensaios, com insucesso completo, usando o virus formolado, ou empregando uma emulsão de substância nervosa fenicada e tratada pelo cristal violeta e pela estufa, até à inativação do virus, a exemplo, em linhas gerais da técnica criada recentemente para a vacinação contra a peste porcina.

Entretanto, do ponto de vista do interesse prático, a vacinação, si for conseguida mais tarde, não apresenta perspectiva de aplicação em larga escala. Seria sem dúvida interessante que se alcançasse, como no caso de outras doenças de virus, uma imunisação solida e duravel, por meio do virus atenuado ou inativado, tratado por agentes físicos ou quimicos. Mas, mesmo quando resolvida no laboratorio, a vacinação teria, fóra deste, secundário interesse, porque só seria indicada em casos restritos: primeiramente, porque apenas seria útil visando cortar as epizootias em bovinos e neste caso teria aplicação unicamente nos focos e no momento dessas epizootias; e como se sabe, a doença tem um carater passageiro, de surtos que surgem e desaparecem, e não é largamente disseminada; em segundo lugar, porque a vacinação dos suinos, espécie em que a doença atinge logo todo o efetivo, não encontraria aplicação, dado o carater benigno da infecção, sendo raras as epizootias que justifiquem medidas especiais.

Para se conseguir por meio de produtos biologicos, imunisantes, um resultado definitivo, teoricamente seriam necessarios dois produtos: um sôro que cortasse logo a serie de casos em bovinos e uma vacina que permitisse realizar uma imunidade duravel. O carater de surtos dispersos da doença não daria margem a larga aplicação desses produtos, que teriam um interesse mais experimental do que clinico.

*

* *

O problema da profilaxia nos focos, estreitamente dependente do conhecimento do agente transmissor e do modo de infecção, isto é, preso à solução da epidemiologia e da patogenia, surgia assim como muito mais tentador, não só porque devia fornecer indicações que ex-

plicassem o subito aparecimento dos focos, como porque poderia dar indicações práticas relativas ao meio de fazer cessar as epizootias em bovinos.

Nos focos brasileiros o assunto estava a reclamar um trabalho de análise clínica e de investigação seriada no laboratorio, pois nestes ultimos anos importantes contribuições de ordem geral se tornaram conhecidas e, no que concerne especialmente à epidemiologia, a literatura recente trazia uma contribuição toda original, interessante e fundamental, mas isolada e unica, obtida em outro foco e que, si confirmada nos focos brasileiros, ganharia o carater de aquisição definitiva, geral e, como consequencia, traria ao problema uma solução pratica, ainda geral e unica. E em nosso meio, onde se sitúa o maior foco da doença, nada havia sido investigado, sob esse aspéto.

Os trabalhos de SHOPE responsabilisam os suinos, nos focos do "Middle West" dos Estados Unidos, como os causadores da propagação do virus aos bovinos e criadores das epizootias. Em outro trabalho reuniremos dados de ordem clinica e epidemiológica sobre essa questão; neste, examinaremos os estudos em serie, realizados com o objetivo de determinar si nos focos brasileiros da doença em bovinos a infecção dos suinos é verificavel, qual a sua incidencia aproximada, e si surgia como um fator constante em todos os focos, no momento das epizootias, ou em seguida ao aparecimento do surto em bovinos.

O interesse especial dos ensaios aqui relatados está no fato de resultados positivos serem constantes quanto à presença da infecção no porco, em sete focos examinados. A incidencia verificada é mesmo geralmente elevada. Reunimos um total de 80 sôros colhidos, individualmente, de suinos, nos sete focos referidos, depois que uma epizootia bem caracterisada, seguida mesmo, às vezes, de isolamento do virus, fôra verificada no efetivo de bovinos. Quasi todos os sôros provêm, pois, de focos em que a doença apareceu no gado.

Procuramos reunir argumentos de ordem clinica e provas experimentais, para responsabilizar o porco como portador de virus e fonte de infecção dos bovinos. A demonstração da presença da infecção no porco, coexistindo com o aparecimento das epizootias, é um elemento essencial.

Antes de examinarmos nossos ensaios, parece indicada uma revista da literatura do assunto, que não é longa, mas essencial e pouco conhecida.

* * *

A primeira aquisição fundamental neste terreno, é a descoberta dos anticorpos neutralisantes do virus de Aujeszky no sôro sanguineo

de algumas especies. Em seguida á identificação da doença, sob a forma de um surto epizootico (24), coube a SHOPE (25), do Instituto Rockefeller, em 1931, o merito de demonstrar que o sôro de algumas especies que passaram por uma infecção dada pelo virus específico, possue anticorpos neutralisantes do mesmo virus, postos em evidencia quando se realiza uma mistura virus-sôro e se inocula em animais sensiveis à infecção experimental.

O autor americano verifica ainda alguns fatos importantes. Constata que é possivel produzir na cobaia um estado de imunidade suficiente para assegurar proteção contra uma dose sempre fatal para cobaias não protegidas. O sôro de cobaia imunisada revela-se capaz de neutralisar o virus.

No momento de suas experiências iniciais a infecção experimental dos suinos não havia sido alcançada. Sabia-se apenas, através de dados esparsos e de ordem puramente clinica, da existencia da infecção natural no porco e no porco selvagem, referida por WEISS, por RATZ e por outros autores hungaros do primeiro periodo da historia da doença. Em suas primeiras tentativas de infecção dos suinos SHOPE (1931) observa os seguintes resultados: em dois suinos inoculados por via subcutanea, um revela um quadro de encefalite aguda, afebril, de evolução rapida, seguida de cura completa; o outro nenhum disturbio de origem nervosa apresenta, passando apenas por um estado de apatia, com inapetencia, febre durante 6 dias e cura imprevista e completa. Do ponto de vista puramente clinico, escreve o autor americano, seria impossivel assegurar que a doença que se desenvolveu nesses porcos era produzida pelo virus. Para obter uma conclusão o sôro desses animais, sangrados depois de completo restabelecimento, 17 e 28 dias depois da infecção, é examinado quanto ao seu poder neutralisante. Ambos êsses sôros, de suinos convalescentes de infecção experimental, neutralisam o virus americano Iowa. O fato sugere a possivel existencia da doença natural do porco. Alem disso, o sôro neutralisante produzido pela amostra americana Iowa neutralisa a amostra classica Aujeszky, procedente da Hungria.

O sôro de suinos que passaram por uma infecção dada pelo virus de Aujeszky é especificamente neutralisante do virus. O sôro de porcos normais, ou imunisados contra outras doenças mostra-se incapaz de exercer tal ação protetora. Parece certo, pois, conclue o autor, que a presença de tais anticorpos pode ser tomada como um criterio de infecção previa do animal.

Continuando investigações sobre o mesmo assunto, SHOPE (1935) vale-se da presença desses anticorpos para verificar a presença da infecção em suinos, pelo exame de sôros de varias regiões dos Estados Unidos.

Experiencias preliminares são conduzidas com o objetivo de conhecer, aproximadamente, a atividade neutralisante normal dos sôros de suinos curados de uma infecção experimental.

Um lote de 8 suinos é infectado por vias diversas, isto é, por contagio diréto, por via nasal, digestiva, subcutanea e intramuscular. O momento da sangria desses animais oscila entre 13 e 57 dias depois da infecção experimental. Os sôros são examinados nas doses de 0,1 — 0,05 e 0,01 em presença de 1 cc. de uma emulsão de cerebro de coelho a 10%, contendo aproximadamente 100 — 1.000 DLM para a cobaia inoculada por via subcutanea.

A amostra de virus usada é a amostra hungara Aujeszky, preferida à amostra americana Iowa, em vista de sua virulencia ligeiramente maior e mais constante para a cobaia inoculada por via subcutanea.

Os 8 sôros de suinos infectados fornecem o seguinte resultado:

Na dose de 0,01 cc. apenas 1 sôro neutralisa o virus.

Na dose de 0,05 cc. 6 sôros são ativos.

Na dose de 0,1 cc. sete sôros são neutralisantes.

*

* *

Esses dados iniciais servem de ponto de partida para investigar a incidencia da infecção em suinos da região do "Middle West" situada no interior dos Estados Unidos, a oeste do Mississipi e compreendendo alguns Estados centrais, em torno do foco primitivo, identificado em 1931, em Johnson County, Iowa. As pesquizas seriadas de SHOPE (29) alcançam então tipos diversos de materiais, assim distribuidos:

I — Em um primeiro trabalho (28) o autor assinála, em 6 epizootias ocorridas em bovinos, o contato frequente desses com suinos, no mesmo cercado; um primeiro sôro de porco é examinado com resultado positivo e logo em seguida, em nova epizootia, mais 6 sôros de porcos e 6 de bovinos sofrem identico teste, um mês depois de cessada a epizootia em bovinos, caracterisada pela ocorrencia de 5 casos em um efetivo de 40 cabeças. Nenhum dos sôros de bovinos neutralisava o virus, enquanto 4 sôros de suinos, de 6 examinados, revelam poder neutralisante. Esses resultados indicavam que, nos bovinos, provavelmente, os animais infectados morrem e nenhum dos que sobrevivem à epizootia passam por qualquer infecção subclinica e não reconhecida. Em relação aos suinos o resultado indicava claramente uma prévia infecção específica dos animais que viviam em contato com os bovinos.

Em seguida, em outro trabalho (29), series de sôro são examinadas:

II — 23 amostras de sôro contra a peste porcina, de produção comercial, representando cada amostra uma mistura de sôros de 50-100-150-175 porcos. Nesta serie, o teste é suficientemente sensivel para revelar um sôro neutralisante mesmo quando diluido a 1 p. 20, uma vez que a experiência prévia mostrara que, na dose de 0,1 e 0,05 cc., os sôros neutralisam quantidade determinada de virus. Uma incidencia de infecção abaixo de 5% não podia ser indicada por essa técnica. Todos êsses sôros provinham de criações locais, produzindo produtos biologicos e colhidos no mercado a éste de Iowa.

Essas 23 amostras de sôros fornecem o seguinte resultado:

a — Duas são negativas, indicando que os sôros desses lotes vinham de porcos indenes, ou que tinham menos de 5% de infectados.

b — Dos outros 21 sôros, 9 neutralisam o virus na dose de 1 cc. e não o fazem na dose de 0,1 cc.. Portanto, nesses 9 a incidencia era de 5%, ou mesmo maior.

c — Os 12 sôros restantes eram ativos na dose de 1 cc. e 0,1 cc., indicando nestes lotes de suinos uma incidencia de infecção acima de 50% e, portanto, uma alta frequencia da doença.

A indicação assim obtida, mostrando que o infecção devia ser tão disseminada e não fosse reconhecida era surpreendente. Surge pois a desconfiança de

que os resultados pudessem ter outra interpretação, reclamando ensaios especiais. Estes são conduzidos para esclarecer a interpretação dos fatos.

Embora parecesse remota a probabilidade de relação imunologica entre o virus de Aujeszky e o da peste porcina, a quasi constante neutralisação do virus pelo sôro comercial da peste tornava necessario eliminar a possibilidade de uma neutralisação inespecifica. Tal eliminação é feita: sôros de porcos hiperimunisados contra a peste porcina não neutralisam o virus de Aujeszky, nem a imunisação contra uma destas doenças confere proteção contra a outra. O mesmo se pode dizer quanto à influenza do porco.

III — Esta serie compreende 15 sôros, tomados individualmente, de animais hiperimunisados contra a peste suina. Destes, 2 são negativos e 13 positivos, examinados na dose de 1 cc., sendo negativos com 0,1 cc.

Este resultado se afasta do que fôra fornecido pelos sôros de infecção experimental, nos quais todos os sôros neutralisantes com 1 cc. ainda são ativos com 0,1 cc.. O titulo baixo destes 4 sôros indicaria uma infecção mais antiga; o titulo teria subido até alcançar um máximo, algum tempo logo depois da cura, e depois teria declinado gradualmente. Uma segunda explicação seria a de que nem todas as amostras de virus dariam, na natureza, o mesmo titulo do sôro.

Admitindo a possibilidade do titulo neutralisante poder estar, todas as vezes, entre 1,0 cc. e 0,1 cc. em vez de entre 0,05 e 0,01 cc., a estimativa da infecção entre suinos, dos sôros misturados, podia parecer muito elevada. A verificação realizada com sôros individuais, nos quais 13 são positivos, de 15 examinados, indica, no entanto, que a alta incidencia verificada nos sôros enfrascados deve corresponder de fato à realidade.

IV — Esta serie é de 10 sôros de porcos sacrificados no matadouro de Lancaster, Pa., procedentes ainda do "Middle West", de regiões diferentes e de porcos de 300-350 libras. Todos são positivos na dose de 1 cc. sendo 6 negativos quando a dose de sôro é abaixada para 0,1 cc.

Em resumo:

Os ensaios com sôros do comercio, misturas de lotes de porcos, dão, em 23 exames, 21 amostras positivas; em 12 amostras a incidencia de infecção entre os suinos fornecedores de sôro deve estar acima de 50%; em 9 a incidencia é de mais de 5%.

Os sôros individuais colhidos igualmente de suinos do "Middle West" em numero de 32, revelam 28 resultados positivos, o que indica uma incidencia aproximada de 87.5% para a infecção específica.

*

* *

O estudo desses anticorpos neutralisantes é em seguida realisado por outros autores, mas em geral quasi sempre em condições experimentais. Vamos, por isso mesmo, passar mais rapidamente sobre tais ensaios. As experiências do autor americano, iniciais no assunto, foram o ponto de partida das nossas e deviam ter aqui mais amplo desenvolvimento.

Gerlach e Schweinburg (5) em 1936, valendo-se das indicações de Shope, conseguem reforçar a imunidade dos animais inoculados que se restabeleceram, obtendo sôros altamente ativos. Duas semanas depois do restabelecimento, inoculam aos suinos doses de 10-25 cc. de emulsões espessas de cerebro de coelhos

infectados. Realizam 6-8 injeções por via subcutanea. No coelho, seguindo a mesma técnica por via subcutanea e peritoneal, fôra usada a dose de 5 cc. e parece que esta ultima via fornece um sôro de titulo mais elevado.

O sôro de suinos ou de coelhos assim tratados pelo virus de Aujeszky, na dose de 0,5 cc. de sôro para 0,5 cc. de virus a 1 p. 100- 1 p. 10, neutralisa qualquer das sete amostras de virus usada pelos autores. Os virus rabicos não são porem neutralisados por êsses sôros, seja o virus fixo, sejo o virus de rua. Como animal de inoculação os autores vienenses servem-se do coelho, mas trabalham com sôros de animais hiperimunisados e em condições experimentais.

Manninger e Marcis (13) em 1937, inoculam suinos e obtêm desses animais sôros neutralisantes.

Os autores hungaros verificam que a dose de 0,1 cc. de sôro neutralisa 100 DLM para o coelho. O sôro neutralisante é desprovido de propriedades imunisantes mesmo usando 5-25 cc. para uma DLM.

Em seguida à observação registrada por Köves e Hirt (11) e por Köves (10), segundo a qual o porco restabelecido de infecção natural adquire imunidade e pode ser hipermunisado, Hirt (9) em 1937, realiza ensaios com sôros de animais curados, com outros de porcos hipermunisados e ainda com amostras de sôros de porcos hipermunisados contra a peste porcina. Os ensaios são feitos por inoculação no coelho por via intramuscular, sendo a DLM 0,01 cc.

No caso dos animais curados os resultados são os seguintes:

O sôro de 9 leitões que sofreram uma infecção benigna, nas doses de 0,03 e mesmo 0,01 cc. neutralisa 25 DLM. Dois meses depois da doença o titulo neutralisante se mantem inalterado e ao cabo de 6 meses baixou em 2 sôros e é o mesmo em 2 outros.

Conclue o autor que quando um sôro de porco protege na dose de 0,1 cc. para 25 DLM para o coelho, o animal passou por uma infecção e está imune.

A segunda serie de ensaios é realizada com sôros de leitões hipermunisados: nove inoculações são feitas com doses de 4-5-10 grs. de material virulento.

Os resultados são:

1 — 14 dias depois da primeira inoculação não ha ação alguma do sôro.

2 — Depois da terceira inoculação o titulo sóbe rapidamente e depois da sexta inoculação 0,0025 cc. de sôro neutralisam 25 DLM.

3 — O sôro neutralisante é destituido de poder protetor *in-vivo*.

Experiências tentando conhecer a possivel existencia da infecção em suinos foram realizadas na Inglaterra por Glover (6). Cabe observar, de passagem, que a doença foi alí verificada clinicamente apenas, mas com informes que não deixam duvidas. Harvey e Reid (8) assinalam sua presença em North Cornwall, na costa sudoeste da Inglaterra; Hart (7) no espaço de 20 anos, assinala seis casos clinicos em vacas de leite, em Enniskillen, distrito da Irlanda, e M'Corny (15) menciona uma epizootia na Irlanda, em 1914.

Glover segue, em linhas gerais, a técnica de Shope. Em 50 amostras de sôros de porcos, misturados de 250 individuos, de varias regiões da Inglaterra, não houve evidencia de anticorpos. O resultado coincide com a raridade da doença em bovinos no país.

Os anticorpos protetores contra o virus de Aujeszky foram ainda postos em evidencia em sôros de *M. rhesus* que passaram por infecção experimental, (Hurst, 1936). O fato parece interessante porque conduz à reflexão quanto à possibilidade de sua existencia no homem.

* * *

Como se vê por esta revista, que contem o essencial sobre o assunto, as conclusões dos diversos autores não se afastam das formuladas pelo pesquisador americano:

1 — Os animais que passaram por uma infecção natural ou experimental revelam no sôro sanguineo a presença de anticorpos protetores.

2 — Os anticorpos são específicos, traduzindo sua presença infecção anterior produzida pelo virus da doença de Aujeszky. Um sôro neutralisante obtido de uma determinada amostra neutralisa todas as amostras do mesmo virus, seja originaria de bovino, de carneiro ou de porco.

3 — Os sôros de porcos hipermunisados contra a peste porcina não neutralisam o virus de Aujeszky. O sôro anti-rabico não neutralisa o virus de Aujeszky nem o sôro deste neutralisa amostras de virus rabico fixo, ou de rua.

Existem apenas certas analogias do ponto de vista imunologico entre o virus de Aujeszky, o virus do herpes e o virus B, postas em evidencia por SABIN (18-19). O ultimo desses virus foi isolado de um caso humano de mielite ascendente, surgido em consequencia de dentada de macaco e é estudado depois por SABIN e WRIGHT, (23) por SABIN e HURST (22). De passagem vale lembrar que foi possivel proteger cobaias contra a infecção pelo virus de Aujeszky, por instilação nasal de sôro neutralisante; mas a proteção é fugaz, desaparece ao cabo de 24 horas, e não foi possivel prolongá-la (20).

Resta ainda referir aquí uma questão. E' a que diz respeito à diferença de comportamento das misturas virus-sôro, condicionada pela especie animal de inoculação.

Na literatura, é conhecido desde 1928 o fenomeno de ANDREWES e TODD, que diz respeito à diferença de comportamento dessas misturas sob influencia da via de inoculação utilizada. ANDREWES (1), trabalhando com o virus vacinico, verifica que uma mistura de virus e sôro, inocua para a pele, é no entanto infectante quando inoculada no testiculo, no cerebro ou na veia. Com o virus III do coelho constata que a neutralisação é prontamente demonstravel por inoculação na pele, menos prontamente por via testicular, e nula por via venosa. TODD verifica fato identico com o virus da peste aviaria: misturas inativas quando inoculadas por via muscular, são infectantes por via venosa. No caso de peste aviaria, a via muscular é tão severa quanto a venosa, ou mesmo mais severa para evidenciar pequena fração de virus livre.

No estudo dos anticorpos neutralisantes do virus de Aujeszky, as experiências iniciais de SHOPE (25) e as de SABIN (21) encontram fenomeno do mesmo tipo, que este autor classifica como um corolario do fenomeno de ANDREWES e TODD: a diferença de comportamento das misturas virus-sôro sob influencia da espécie animal usada nas inoculações e das doses proporcionais de virus e de sôro empregadas.

Em 1931 SHOPE (25) inocula habitualmente cobaias por via subcutanea e verifica uma ação protetora nítida, do sôro. A mesma mistura no coelho, em doses identicas de virus e sôro, não oferece proteção. O autor assinala que com

maiores doses de sôro e menores doses de virus a proteção do coelho é tambem assegurada.

O fato é especialmente estudado por SABIN (21), que fazendo variar as quantidades de virus e de sôro, inocula paralelamente a cobaia e o coelho, e verifica:

a — 0,1 cc. de sôro ordinariamente protege a cobaia contra 1 cc. de virus a 1 p. 10, em inoculação subcutanea.

b — no coelho no entanto, 3 cc. de sôro, isto é, uma dose trinta vezes maior, deixa de oferecer proteção contra a mesma dose de virus.

c — quando porem a quantidade de virus é reduzida para um decimo da dose inicial, mesmo pequenas quantidades de sôro asseguram a proteção do coelho.

A variação da capacidade protetora dos sôros deve depender de fatores ligados ao tecido subcutaneo das duas espécies, e o autor vale-se desses dados para discutir a interpretação do mecanismo de imunidade nas doenças de virus. SABIN verifica ainda, que na cobaia as misturas, neutras por via subcutanea, o são ainda por via nasal e cerebral.

No curso de nossos ensaios, em series de sôros, encontramos diferenças de resultados no coelho e na cobaia, que só nos parecem explicaveis pelo fenomeno de SHOPE e SABIN. E' importante assinalar esses resultados, que não correm paralelos, pois seu desconhecimento levaria a considerar como destituidos de anti-corpos sôros que por inoculações realizadas na cobaia revelam uma ação protetora nítida e mesmo elevada.

*

* *

A frequencia com que surtos epizooticos da doença de Aujeszky irrompem no foco brasileiro, levou-nos a tentar investigações seriadas, com o objetivo essencial de determinar si em nosso meio e nos focos da doença em bovinos, no momento das epizootias, ou depois de sua eclosão, o porco revelaria, pela prova de proteção de sôros, uma infecção específica dada pelo virus de Aujeszky. Um primeiro resultado positivo, alcançado já em 1937, mas isolado, em um primeiro foco, indicava que o problema devia ser levado mais longe. Fixamos depois, como questões a determinar, em primeiro lugar a incidencia de infecção nos suinos, nos focos da doença, e em segundo lugar precisar si a presença dessa infecção era constante, sem exceções, em todos os focos em que a peste de coçar surgia, vitimando lotes de vacas de leite nos currais. Interrupções involuntarias, mais de uma vez marcaram estes ensaios, que só agora foram concluidos, alem das que resultam da necessidade de aguardar o aparecimento dos focos, e de dificuldades materiais do trabalho.

Em publicação anterior, sob a forma de comunicação previa (3), fizemos conhecer os primeiros resultados. Em outro trabalho (4) fixamos indicações essenciais relativas ao uso da via intramuscular na cobaia, como mais severa que a subcutanea, permitindo trabalhar com

amostras brasileiras de virus e organizar uma rotina facil e segura. Parece agora oportuno reunir sôros numerosos de outros focos, acompanhados de dados complementares, fornecendo resultados de dosagens dos sôros e discutir consequencias das experiências realizadas.

Ao lado de dados de varias procedencias, alcançando numerosos focos epizooticos, relativos á presença da infecção no porco pela prova de proteção, procuramos reunir dados clinicos e epidemiologicos que tendem, com a força de argumentos constantes, repetidos em todos os focos, a responsabilizar o porco pela transmissão da doença aos bovinos. Estas questões, referidas acidentalmente aqui, serão examinadas em outro trabalho.

Vamos percorrer sucessivamente os diversos grupos de sôros examinados. Algumas informações complementares são reunidas, relativas ao numero de casos ocorridos em bovinos, numero de suinos existentes, condições de contacto das duas espécies, época de aparecimento do foco, momento da sangria. Antes disso, é conveniente dar algumas indicações técnicas.

TÉCNICA DE TRABALHO

Com ligeiras variantes, obedeceu às indicações de SHOPE. Invariavelmente, porem, só examinámos sôros colhidos individualmente, sem que tenha sido testados sôros de mistura. Todos os nossos sôros provinham, alem disso, de porcos seguramente em contacto com bovinos no curral, ou no mangueirão, algum tempo depois da ocorrência do fóco de peste de coçar, ou logo depois. Quando condições especiais responsabilisavam um determinado lote de porcos, mais em contacto com os bovinos, esse lote era preferido. Assim, no caso de Laranjal, onde reunimos sôros de leitões de preferencia ao de adultos, porque eram eles que zombavam dos cercados frageis. ou das cercas de reguas com espaços largos, ganhando o local reservado às vacas de leite e aos bezerros.

Em presença da dificuldade prática de surpreender epizootias autenticas no porco, que devem existir, embora passem despercebidas, principalmente no nosso meio rural e em criação extensiva, tentamos a pesquisa diréta do virus de porcos, seja por autopsia, seja por coleta de mucus nasal; os resultados foram negativos, o que parece explicavel pelo desaparecimento do virus, do organismo, conforme adiante se discutirá.

A sangria dos porcos era invariavelmente realizada no laboratorio, por secção da cauda com auxilio do vacuo, e o sangue recolhido em frascos Kitasato munidos de um tubo de vidro encurvado, adaptavel à cauda e terminando em ponta, na sua porção interna, que fica colocada dentro do frasco.

A m o s t r a d e v i r u s — A amostra de virus usada foi a n.º 4 de nossa coleção, isolada, em dezembro de 1934, do cerebro de uma vaca, que teve doença bem caracterizada, com prurido na região cervical anterior Esta amostra conta já cerca de 100 passagens pelo cerebro do coelho e a sua D L M para este animal, por via subcutanea, e para a cobaia, por via intramuscular, será examinada mais longe.

O material de virus é constituido de emulsão a 10% de cerebro de coelho que sucumbe em 42-50 horas, em média, a uma inoculação intracerebral. O virus é conservado em glicerina fosfatada a 4ºC. durante cerca de uma semana; evitamos usar material conservado por mais tempo, para fugir a um possivel empobrecimento. A emulsão de virus é preparada por uma cuidadosa trituração no gral, de modo a ter uma emulsão fina, sem que haja necessidade de qualquer artificio, como centrifugação, para remover particulas de substancia nervosa. O virus foi assim usado sempre na dose de 1 cc. de uma emulsão a 10%, correspondendo a 100 mgr. de substancia nervosa e a 250 D L M para a cobaia, por via muscular, e 500 D L M para o coelho, por via subcutanea.

Teste de neutralisação — A mistura virus-sôro era realizada inicialmente com 1 cc. de virus a 1 p. 10 em presença de 1 cc. de sôro. Quando resultados positivos eram alcançados, o sôro era examinado na dose de 0,5-0,1-0,05 e 0,01 cc. A mistura era conservada à temperatura ambiente 30 m. e depois cerca de 17 horas na geladeira, embora se saiba, pelos ensaios de varios autores, que a incubação é desnecessaria, como veremos.

Animal de inoculação — Usamos em um primeiro ensaio, o coelho e a cobaia. Em seguida, ante resultados negativos e surpreendentes no coelho, nas doses habituais de sôro e virus, resultados que devem ser explicados, em parte pelo menos, pelos ensaios de SABIN, anteriormente referidos, passamos a só inocular cobaias. Diluições sucessivas do virus a 1 p. 100 - 1 p. 200 - 1 p. 500 não forneceram melhor resultado no coelho.

Via de inoculação — Como vimos em trabalho anterior (4), o uso da via subcutanea, na cobaia, no caso da nossa amostra de virus, não permite organizar qualquer rotina. A via é pouco severa, de resultados inconstantes, e os animais inoculados com misturas feitas de sôros normais resistem com frequencia. SHOPE contornou dificuldade identica trabalhando com a amostra hungara, de virulencia ligeiramente maior e mais constante por essa via.

TABELA 1

Determinação da D L M da amostra n.º 4 do virus de Aujeszky por via subcutanea no coelho

Animal Coelho	Diluições	Grs.	Via	Resultado
9283	1 p. 10	0.1	Sub-cut.	+
9284	1 p. 100	0.01	»	+
9285	1 p. 1.000	0.001	»	+
9286	1 p. 2.000	0.0005	»	+
9770	1 p. 5.000	0.0002	»	+
9769	1 p. 10.000	0.0001	»	+
9961	1 p. 10.000	0.0001	»	— observação
9960	1 p. 20.000	0.00005	»	— 45 dias
9963	1 p. 50.000	0.00002	»	— » »
9962	1 p. 100 000	0.00001	»	— » »

D L M do virus para coelho e cobaia — Resulta de nossos ensaios anteriormente relatados, que a via intramuscular na cobaia é severa e de resultados constantes. A D L M pode ser tomada pelo menos como sendo de 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 2.500 correspondendo a 0,0004 grs. Si pretendermos um pouco mais de elasticidade, a D L M poderá ser tomada mesmo como sendo 1 cc. de emulsão a 1 p. 5.000, correspondendo a 0,0002 grs. Desse modo a dose de virus usada contem cerca de 250 D L M para a cobaia, ou mesmo estaria entre 250-500 D L M.

A D L M desta mesma amostra para o coelho, inoculado por via subcutanea, está expressa na tabela n.º 1. Como se vê, em dois coelhos inoculados com a diluição a 1 p. 10.000, um morre e outro resiste. As diluições mais altas não fornecem resultado, tendo sido observados os animais durante o longo periodo de 45 dias, muito alem da incubação mais alta registrada por REMLINGER e BAILLY (16-17), que é de 13 dias. O limite da D L M para o coelho, por via subcutanea, é, pois, aproximadamente, 1 cc. de emulsão a 1 p. 5.000, correspondendo a 0,0002 grs. ou estaria mesmo, entre 1 p. 5.000 e 1 p. 10.000. Desse modo a dose de virus usada contem 500 ou, mesmo, de 500-1.000 D L M, para o coelho. Esses ensaios foram feitos com virus de 5.ª-14.ª-16.ª passagem pelo cerebro do coelho e material em glicerina fosfatada. No gelo, em nossas condições de trabalho, o virus tem uma longa conservação, que foi verificada 57-94-126 dias. Mais tarde vimos que o cerebro do coelho ainda é virulento ao cabo de 12 meses, pelo menos, periodo ainda inferior ao que registram outros autores (17).

Em cada propriedade um lote de porcos era adquirido em seguida ao aparecimento do foco. A sangria era feita no laboratorio, por secção da cauda, com auxilio do vacuo. Em porcos maiores, ás vezes o vacuo é dispensavel. Algumas vezes a punção cardiaca foi realizada e bem sucedida, quando não trouxesse consequências posteriores, como aderência do pericardio e complicações pulmonares.

Primeira serie: Foco de Laranjal

Surgido em janeiro de 1937, o foco epizootico de Laranjal é interessante porque, sendo o primeiro examinado, fornece logo resultados significativos. Alem disso, pelo conjunto de circunstancias especiais que cercavam o ambiente local, permitiu examinar logo um pequeno lote que devia ser especialmente responsabilizado, o qual forneceu resultados positivos e uma indicação favoravel.

No espaço de 12 dias, houve 8 casos da doença em bovinos, e depois ainda outros. Os dados relativos a aspetos clinicos e epidemiologicos serão examinados a parte. Vimos aí tres casos, e de um, o unico que autopsiámos, o virus foi facilmente isolado da medula lombar, enquanto o cerebro forneceu resultado negativo. Em outro trabalho nos ocupamos dessa questão (2).

Possuindo a fazenda uma criação de porcos, e provida de instalações que permitiam a criação deles em um grande mangueirão, separado do mangueirão das vacas e do curral de ordenha, por boa cerca, parecia, a primeira vista, que o contacto entre as duas espécies não existia. De fato a porcada toda não tinha contacto com a criação de

bovinos. Mas os leitões atravessavam com facilidade determinado ponto da cerca, feita de taboas a espaços largos.

O lote de leitões era de 25 cabeças. A pesquiza direta de virus na mucosidade nasal em alguns leitões, por lavagem a agua fisiologica, foi negativa. A colheita foi aí realizada em pleno periodo da epizootia e o resultado negativo póde ser agora explicado por duas razões: 1 — pelas condições de trabalho, sendo a colheita realizada no foco e o material de lavagem nasal usado, a agua fisiologica, veículo em que o material recolhido permaneceu até ao laboratorio; 2 — o periodo de eliminação do virus podia ter já decorrido, pois a infecção dos bovinos devia ter-se dado 10-15 dias antes do desenvolvimento dos sintomas.

Alguns exemplares foram autopsiados, sem resultado. Desse lote de leitões, 12 foram transportados para o laboratorio e 9 forneceram sôros, que foram examinados do ponto de vista da prova de proteção no coelho e na cobaia. Somente 4 meses depois da ocorrência do surto epizootico o sôro dos leitões pôde ser obtido e examinado: desse modo, durante algum tempo esses leitões continuaram a vida habitual da criação, mas a cerca do mangueirão dando acesso aos locais do gado bovino fôra reforçada no sentido de isolar completamente, as duas espécies.

Os resultados no coelho, surpreendentes no caso da Tabela 2, porque se afastam dos de SABIN, estão nas tabelas 2 e 3, referindo-se

TABELA 2

Exame dos sôros do foco de Laranjal, do ponto de vista da presença de anticorpos neutralisantes.

Época do aparecimento do foco: janeiro de 1937.
Sangria dos leitões: 24.5.37. Ensaio: 24.6.37

N.º do soro	Virus 1 p. 10	Animais inoculados	Via de inoculação	Resultado	Tempo da observação
1	1 cc.	Coelhos 592	Subcutanea	— (*)	13 dias
2	»	593	»	—	»
3	»	596	»	—	32
4	»	661	»	—	29
5	»	662	»	—	32
6	»	663	»	—	32

Sôro porco normal:

1 cc.	1 cc.	664	»	+ 3 dias	Sintomas e lesão local

(*) — = resiste e o sôro protege
+ = morre e o sôro não protege

respectivamente, a um ensaio com 1 cc. e 0,2 de sôro para a mesma dose de virus. Como se vê, um resultado nítido foi verificado com 1 cc. de sôro e um resultado negativo com 0,2. Este segundo ensaio, porem, foi feito com sôro de uma segunda sangria, em 1.7.37. Verifica-se que os sôros dos seis leitões neutralisam 500 D L M para o coelho, quatro meses depois da ocorrência do foco em bovinos.

TABELA 3

Exame dos sôros de Laranjal, com 0,2 cc. de sôro, por inoculação no coelho, 5 meses e meio depois da ocorrência do foco. Sangria em 1.7.37

N.o de soro	Animal	Dose de soro	Dose de virus	Via	Data	Resultado
1	Coelho 768	0,2	1 cc. 1p. 10	Sub cut.	20-7-37	+ 23-7-37
2	769	»	»	»	»	+ »
3	770	»	»	»	»	+ 24-7-37
4	771	»	»	»	»	+ »
5	772	»	»	»	»	+ »
6	773	»	»	»	»	+ »
Teste:						
Sôro normal	774	0,2	1 cc. 1p 10	Sub cut.	20-7-37	+ 22-7-37

E x p e r i ê n c i a s c o m o s ô r o d o s l e i t õ e s d e L a r a n j a l e m c o b a i a s. Estes ensaios só foram realizados com sôros da segunda sangria, isto é, 5 meses e meio depois que o foco surgira na fazenda. Aquí 9 sôros foram examinados e 3 controles usados, incluindo o de um leitão inoculado de peste porcina e que sucumbiu à infecção experimental. Em outras experiências, sôros comerciais de peste porcina, procedentes da Argentina, foram quasi sempre acrescentados à serie de controles e nenhuma vez revelaram poder neutralisante. Cabe assinalar, de passagem, que a doença não existe na Argentina.

Os resultados estão resumidos na tabela 4 e aí se vê nitidamente, que resultados positivos foram obtidos com 1 cc. e 0,5 cc. de sôro em presença da mesma dose de virus, contendo cerca de 250 D L M.

Confrontando os resultados das tabelas 2 e 4, exceção dos sôros 7-8-9, que só foram examinados por inoculação na cobaia, verifica-se uma concordancia completa de resultados nas duas espécies. Os animais inoculados com as misturas feitas com sôros normais, prove-

TABELA 4

Pesquisa do poder neutralisante dos sôros de suinos do foco de Laranjal em cobaias, via intramuscular.

Sangria: 5½ — 6 meses depois da ocorrência do foco.

N.º do sôro	Animal cobaia	Virus 1 p. 10	Dose de sôro	Data	Resultado	Tempo de observação
1	706	1 cc.	1 cc.	7-7-37	—	15 dias
2	707	»	»	»	—	12
3	708	»	»	»	—	23
4	709	»	»	»	—	»
5	710	»	»	»	—	»
6	711	»	»	»	—	»
7	786	»	»	»	—	9
8	787	»	»	»	—	23
9	788	»	»	»	—	23
1	713	1 cc.	0.5	»	—	23
2	714	»	0.5	»	—	»
3	715	»	0.5	»	—	»
4	716	»	0.5	»	—	»
5	717	»	0.5	»	—	»
6	718	»	0.5	»	—	»
Controles:						
A normal	712	1 cc.	1 cc.	7-7-37	+ 9-7-37	
B p. suina	789	»	»	»	+ »	
D normal	790	»	»	»	+ »	
E »	791	»	»	»	+ »	
A »	719	»	0.5	»	+ »	

nientes de porcos de zonas onde não havia doença e previamente examinados, morreram dentro do periodo de incubação habitual, depois de revelar sintomas de prurido local e lesão típica.

E' necessario observar que esses resultados, 4-6 meses depois que o foco surgira em bovinos não podem evidentemente ser tomados como índice de infecção no foco e no momento da epizootia, pois os leitões continuaram em contacto na fazenda, e no Instituto foram conservados juntos. Conhecido o carater contagioso da infecção,

pode-se prever que alguns, pelo menos, foram contagiados depois de saidos do foco. Mas, em outras series, estudadas mais tarde, feitas de porcos sangrados logo depois da ocorrência do surto em bovinos, a possibilidade de um contagio posterior, que se denunciasse pelo exame do sôro, é afastada ou muito diminuida, pelo conhecimento da data de sangria, comparada com o periodo de aparecimento dos casos. O número de resultados positivos traduzirá, então, de modo bem proximo da realidade, a incidencia media da infecção. SHOPE faz aos seus resultados reserva identica; este assunto será de novo examinado adiante.

Segunda serie: Foco de Pirajú

Em uma fazenda houve um pequeno surto constituido de 5 casos. Havia indicações clinicas tendentes a responsabilizar os suinos, em vida livre junto do gado leiteiro, na séde. Apenas 4 sôros foram examinados. E' possivel ver aí um resultado positivo em dois sôros, dos 4 examinados, de n.os 10 - 11 - 12 e 13 da nossa serie geral.

Terceira serie: Foco de Cravinhos

Em novembro de 1938 uma terceira serie pôde ser realizada. Em Cravinhos, na E. F. Mogiana, surgiu um foco, que nos foi notificado pelo Dr. C. Xavier, veterinario do Instituto, que realizou autopsia de um caso e nos remeteu material, de onde o virus foi logo isolado.

Em presença de resultados anteriores, obtidos no coelho, pensamos que seria possivel continuar os exames seriados dos outros focos usando o mesmo animal, ou paralelamente, os dois reagentes, coelho e cobaia, em condições identicas. Alguns autores europeus se serviram do coelho muito embora os ensaios de SHOPE tivessem sido realizados, em serie, na cobaia.

Nosso objetivo essencial consistia em determinar a incidencia da infecção no porco. Os resultados comparados, de uma serie de sôros negativos no coelho e nitidamente positivos na cobaia, vão porem aquí documentados, porque dão uma indicação, baseada em series de sôros, mostrando que em condições identicas de doses de virus e de sôro, os resultados são diversos. E' muito provavel que reduzindo as quantidades de virus e sôro, no sentido dos ensaios de SHOPE e de SABIN, os resultados fossem positivos no coelho, como o foram na cobaia, o que não pôde ser verificado. Estamos procurando realizar a imunização de suinos e de cobaias com o objetivo de examinar esta questão.

O foco de Cravinhos permitia uma analise de resultado precioso, porque a criação de porcos era constituida apenas de um reduzido efetivo, de 45 cabeças, de modo que era mais facil examinar uma porcentagem alta de sôros. Examinando 12 sôros teriamos um resultado sobre mais de 25% do efetivo existente na fazenda.

Em uma criação de cerca de 100 bovinos, no espaço de alguns dias, apareceram 10 casos da doença, matando vacas. Era a segunda vez que o mal aparecia nessa propriedade.

A serie de casos de peste de coçar em bovinos deu-se durante a segunda quinzena de novembro de 1938. A autopsia de um caso e colheita de material foram realizadas em 24 de novembro. Uma visita à propriedade foi realizada cerca de 35 dias depois do inicio do foco e 20 dias depois do seu desaparecimento. O peso dos porcos oscilava entre 11 quilos para os menores, 15 para os medios e 30 para os maiores.

Uma primeira sangria foi realizada um mês depois do aparecimento do foco. Ensaios no coelho, por via subcutanea, com 1 cc. de virus para 1 cc. de sôro, foram negativos, conforme se vê na tabela 5. A ausência total de resultados positivos deve correr por conta da diferença de comportamento das misturas sob influencia da especie usada. Uma modificação de técnica, submetendo as misturas a uma permanencia de 30 m. a 37°, não altera os resultados no coelho, e o mesmo se pode dizer de uma tentativa diluindo o virus a 1 p. 100, isto é, usando 50 D L M em vez de 500. As experiências foram interrompidas quando nos propunhamos examinar os mesmos sôros dentro dos resultados de Sabin.

TABELA 5

Resultados negativos no coelho, nas provas de proteção realizadas com sôros de porcos do foco de Cravinhos.

Aparecimento do foco: novembro 1938
Sangria: 20-12-38

N.º do sôro	Coelho	Sôro	Virus	Data	Resultados
14	2.061	1 cc	1 cc 1p. 10	24-12-38	+ P L
15	62	»	»	»	+ »
16	63	»	»	»	+ »
17	64	»	»	»	+ »
18	65	»	»	»	+ »
19	66	»	»	»	+ »
20	67	»	»	»	+ »
21	68	»	»	»	+ »
22	69	»	»	»	+ »
23	70	»	»	»	+ »
24	71	»	»	»	+ »
25	72	»	»	»	+ »
Controles:					
A Normal	73	1 cc.	1 cc 1p. 10	24-12-38	+ P L
B »	74	»	»	»	+ »
C »	75	»	»	»	+ »
D »	76	»	»	»	+ »

Os sôros de Cravinhos forneceram, na cobaia, um resultado plenamente satisfatório. Antes de tudo um ensaio na cobaia mas usando a via subcutanea mostrou a impossibilidade de continuar com esta via de inoculação. Mesmo as cobaias inoculadas com as misturas feitas com sôros normais com frequencia nenhuma reação apresentam, de modo que não é possivel organizar qualquer rotina usando essa via. A via intramuscular, ao contrario, fornece resultados excelentes e resolve a dificuldade. Daí por diante essa técnica foi regularmente seguida.

Os ensaios na cobaia foram realizados com os mesmos sôros, conservados na geladeira cerca de 6 meses. Os resultados estão reunidos na Tabela 6. Experiências com menores doses de sôro para a

TABELA 6

Presença de anticorpos neutralisantes do virus em sôros de porcos de Cravinhos. Inoculações na cobaia por via intramuscular.

N.o do sôro	Cobaia	Sôro	Virus	Via	Data	Resultado
14	5022	1 cc.	1 cc. 1p. 10	Intra muscular	4-8-39	—
15	23	»	»	»	»	—
16	24	»	»	»	»	—
17	25	»	»	»	»	—
18	26	»	»	»	»	—
19	27	»	»	»	»	—
20	28	»	»	»	»	—
21	29	»	»	»	»	—
22						
23	30	»	»	»	»	—

Controles: sôros de porcos normais:

A	5041	1 cc.	1 cc. 1p. 10	Intra muscular	4-8-39	+ 7-8-39
D	42	»	»	»	»	+ »
E	43	»		»	»	+ »

mesma dose de virus estão reunidos na Tabela 7, e mostram de modo nítido a existencia de uma ação protetora desses sôros nas doses de 0,5 e 0,1 cc.

É interessante ressaltar que todos esses sôros, si julgados apenas pelas experiências no coelho, em identicas condições, seriam conside-

TABELA 7

Experiências com os sôros de Cravinhos, com doses inferiores de sôro para a mesma quantidade de virus. (Cobaias por via muscular)

N.º do sôro	Cobaia	Virus	Sôro	Resultado	Cobaia	Virus	Sôro	Resultado
14	4892	1cc 1p 10	0.5	—	5051	1cc 1p 10	0.1	—
15	95	»	»	—	52	»	»	—
16	93	»	»	—	53	»	»	—
17	4903	»	»	—	54	»	»	—
18	4816	»	»	—	55	»	»	—
19	4890	»	»	—	56	»	»	—
20	6026	»	»	—	57	»	»	—
21	6027	»	»	—	58	»	»	—
22								
23	6028	»	»	—	59	»	»	—
24								
25	6029	»	»	—	61	»	»	—

Controles:

D-sôro normal	6030	1cc 1p 10	0.5	+ P L	5062	1cc 1p 10	0.1	+ P L
E »	31	»	»	+ P L	63	»	»	+ P L
F »	32	»	»	+ P L	64	»	»	+ P L
G »	33	»	»	+ P L	4926	»	»	+ P L

rados como destituidos de anticorpos neutralisantes, embora se possa supor que um ensaio, mesmo no coelho, mas com reduzidas doses de sôro e de virus, forneceria resultados identicos aos da cobaia.

Quarta serie: Foco de Gironda

Em Gironda, na E. F. Mogiana, existia um lote de 13 bovinos, sendo 9 vacas e 4 novos, atingido por um surto em março de 1939. Em poucos dias verificaram-se 6 casos de peste de coçar, sendo 5 em vacas e o sexto em uma bezerra. Em todos os casos o prurido surgira na região posterior do corpo, como é de regra. O gado em cujo efetivo houve esta serie de casos, atingindo quasi 50% do lote, vivia em condições especiais, as mais improprias possiveis do ponto de vista sanitario: — solto dentro de um vasto mangueirão destinado à criação de porcos, onde havia cerca de 80 suinos, de todas as idades e tamanhos. Fóra desse lote de bovinos, havia na fazenda outro, de 15-20 cabeças, no pasto, sem contato com suinos. Nesse lote não houve casos da doença.

Uma serie de 9 sôros foi obtida, datando a primeira sangria de 5-4-39, isto é, 20-30 dias depois da ocorrência do surto. Um exame desses sôros por inoculação no coelho, na dose de 1 cc. de sôro para 1 cc. de virus a 1 p. 10, fornece resultados negativos.

TABELA 8

Ensaios com os sôros do foco de Gironda, realizados em cobaias inoculadas por via intramuscular.

Aparecimento do foco: março de 1939
Sangria: 5-4-39

N.o do sôro dos porcos de Gironda	Doses de sôros misturadas a 1 cc. de virus a 1p. 10 correspondendo a 250 DLM para a cobaia		
	1 cc.	0.5 cc.	0.1 cc.
	Resultado	Resultado	Resultado
26	—	—	—
27	—	—	—
28	—	—	+ 5 dias
29	—	—	—
30	—	—	—
30	—	—	—
31	—	—	—
32	—	—	+ 3 dias
33	—	—	—

Sôros de controle:

A	+ P. L.		
D	+ P. L.	+ P. L.	+ P. L. 3 dias
E	+ P. L.	+ P. L.	+ P. L. 45 horas
F		+ P. L.	+ P. L. 45 horas
E		+ P. L.	+ P. L. 2½ dias

As experiências na cobaia foram feitas 4 meses depois, com sôros da mesma sangria de 5-4-39, guardados a 4° C. A tabela n.° 8 resume esses ensaios na cobaia com 1- 0.5- 0.1 cc. de sôro, com resultados positivos, com exceção apenas de dois sôros que dão resultados negativos com 0.1. O sôro n.° 28 parece revelar ainda, com 0.1 cc., um poder neutralisante incompleto, ou parcial, denunciado por uma incubação retardada para 5 dias, enquanto os controles têm uma incubação uniforme de 2½ a 3 dias.

Quinta seria: Foco de Sertãosinho

No município de Sertãosinho, numa criação de 30 vacas de leite, aparece um unico caso da doença, em uma vaca de 8 anos, com temperatura de 40°9, disturbios respiratorios, inquietação excessiva e sobretudo prurido intenso e persistente. A autopsia foi realizada pelo dr. Xavier, dez horas depois do inicio da evolução da molestia. O virus foi logo isolado. No lote das vacas só essa adoeceu e os sintomas se manifestaram 10 dias depois do parto. Surge a hipotese da gestação avançada e do parto funcionarem como fatores secundarios de infecção, pondo em contato com o exterior uma superfície mucosa extensa, congestionada e traumatisada, alem de provocar a aproximação e contato direto dessas superfícies com materiais virulentos de leitões, que atraidos pelo cheiro ingerem fragmentos de tecidos, lambem o sangue de lesões locais ou arrancam mesmo fragmentos de placenta.

As 30 vacas leiteiras vivem em regime de pasto, mas vêm ao curral duas vezes por dia e dormem num grande mangueirão em contato com porcos. A fazenda tem uma grande criação de porcos. Cerca de 200 cabeças não têm contato nenhum com o gado bovino, mas um lote de 300 suinos, de mais de 6 meses, tem contato frequente.

A sangria se fez 13 dias depois que houve o caso clinico na vaca autopsiada, isto é, com um praso bem menor do que no caso dos outros focos anteriores, entre o aparecimento da doença e o exame dos sôros. Este detalhe explica, em parte pelo menos, por que só são encontrados 8 sôros positivos em 19 examinados e talvez ainda, por que o titulo dos sôros é baixo.

O resultado geral do foco de Sertãosinho distribue-se do seguinte modo, conforme tabela 9:

Com 1 cc., 8 sôros revelam ação protetora nítida: 38-41-42-43-47-48-49-51. Com 0.5 cc. apenas tres sôros são positivos: 41, 48, 51. Com 0,1 cc. de sôro nenhuma das amostras oferece proteção.

Considerando que uma neutralisação de 1 cc. de sôro para 1 cc. de virus é indice nítido de infecção, verifica-se que em 19 sôros examinados, 8 neutralisam o virus, o que revela um índice de infecção de 42.1% no lote adquirido.

O fato dos porcos terem sido adquiridos logo depois que a doença surgiu no gado, aliado à circunstância da sangria ter sido praticada logo depois, isto é, 15 dias depois que o caso da peste de coçar foi verificado, permite admitir que o índice de 42% representa, de fato, aproximadamente, a incidencia da infecção no porco no foco examinado, pois não havendo longa permanencia do lote examinado no Instituto, ainda que o contagio continuasse a se processar entre os suinos, durante esse intervalo de 15 dias, a sangria, quando realizada, não permitia esperar que todos já estivessem em periodo de fornecer sôros ativos.

TABELA 9

Exames dos sôros de suinos do foco de Sertãosinho pela prova de proteção na cobaia por via intramuscular.

Sangria: 10.4.40 — 14 dias depois do aparecimento da doença em bovino. Ensaio em 25.4.40

N.º dos sôros de porcos	Doses de sôros incorporadas a 1 cc. de virus a 1 p. 10 correspondendo a 250 D L M para a cobaia		
	1 cc.	0.5	0.1
	Resultado	Resultado	Resultado
35	+ + +	+	
36	+		
37	+ +	+	
38	— —		+
39	+	+	
40	+		
41	— —	—	+
42	— —	+	
43	—	+	
44	+		
45	+		
46	+		
47	—	+	
48	— —	—	+
49	—	+	+
50	+		
51	— —	—	+
52	+		
53	+		
Controles:			
H - sôro peste argentino	+	+	+
I - sôro normal	+	+	+
J - » »	+	+	+
K - » »	+	+	+
L - virus 1 p. 10	+		

A repetição + ou — indica que esses sôros sofreram varios testes.

A diferença de resultados entre o foco de Sertãosinho e outros, como o de Cravinhos, o de Gironda, nos quais os resultados são todos

positivos, deve ter explicações nessa diferença mais ou menos larga dos periodos que medeiam do momento da sangria ao do aparecimento do surto no gado bovino.

Parece haver ainda aquí uma indicação no sentido de se admitir que a infecção dos suinos é primaria e não consequente à infecção dos bovinos. HIRT, realizando a imunisação do porco, verifica, em dois animais, que 14 dias depois da primeira inoculação, o sôro de dois leitões não neutralisa ainda o virus. SHOPE, por outro lado, em um caso de infecção por via nasal e em outro por via intramuscular, encontra já anticorpos ao cabo de 13 e 14 dias respectivamente.

Sexta serie: Foco de Bebedouro

No município de Bebedouro, durante o mês de julho de 1940, apareceu um surto epizootico mais ou menos grave. Uma serie de 19 casos em uma criação de 90 cabeças, entre vacas e bezerros, caracterisou a gravidade deste foco, o que indica uma incidencia de 21% e mostra como os prejuizos podem tomar vulto em uma propriedade atingida.

A promiscuidade do gado de leite com os porcos é evidente. A criação de porcos está em más condições higienicas, com os fatores negativos presentes em criações primitivas e defeituosas.

O proprietario possue outra fazenda onde a doença não foi verificada no gado, embora condições favoraveis existam. Esta segunda criação forneceu alguns sôros de resultados positivos.

O foco de Bebedouro forneceu 21 sôros; destes, 7 com a marca B na tabela 10, provêm da fazenda onde a doença não apareceu e 14, da fazenda atingida pela peste de coçar. A relação desses sôros está na tabela 10, onde assinalamos a idade aproximada dos porcos, as doses de sôro usadas e os resultados.

O foco surgiu em bovinos durante o mês de junho e chegou ao nosso conhecimento em 26 deste, quando 17 casos já se tinham sucedido no espaço de duas semanas. Houve depois mais dois casos. Não nos interessamos especialmente pelo isolamento do virus de bovinos, porque dispunhamos já de mais de 15 amostras e a caracterisação clinica do foco era suficientemente demonstrativa. O lote de suinos foi retirado do foco em 9, e as sangrias realizadas em 15 e 19. Houve pois, um periodo de 15-20 entre o ultimo caso da doença no gado e a sangria dos porcos.

O resultado foi o seguinte:

Em 15 sôros do foco da doença, 6 são positivos. Em 6 sôros da outra criação, 2 são ainda positivos. O resultado geral será, portanto, de 8 sôros positivos em 21 examinados.

A infecção nos suinos existia não só na criação procedente da fazenda em que o surto apareceu, como na outra criação de porcos, em que a doença no gado não foi verificada, em presença dos seguintes dados: os sôros 68 e 69, que deram um resultado nitidamente positivo, provenientes da fazenda onde a doença não apareceu, foram obtidos em 15 de julho, isto é, 8-10 dias depois que a mistura dos porcos foi realizada e desse modo não é provavel que a presença de anticorpos tenha corrido por conta de uma infecção posterior, isto é, já realizada no Instituto.

Não é surpreendente que um fáto dessa ordem se verifique. Não deve ser tomado como um criterio absoluto que infecção do porco seja sempre seguida de doença no gado bovino. Um resultado inverso, indicando doença no gado e ausencia de infecção no porco, seria, sim, surpreendente, porque tornaria obscura a interpretação da genese do contagio aos bovinos, ou exigiria uma explicação numa direção diversa.

Si, como o demonstram esses resultados positivos, a infecção no porco existe na criação e na fazenda em que a doença no gado não se verificou, é claro que isso é um argumento valioso no sentido de permitir a conclusão segundo a qual a infecção no porco é em geral primaria e não secundaria ou consequente à doença no gado bovino.

A literatura e as proprias características clinicas da doença no seu conjunto fornecem indicações e argumentos no sentido de reforçar esses dois ultimos conceitos, que devem ser fundamentais na edificação da epidemiologia.

Os resultados de SHOPE (29), revelando alta incidencia da infecção nos suinos e indicando mesmo sua larga distribuição em regiões do Middle West, fornecem indicações não só no sentido de mostrar que infecção dos suinos não é obrigatoriamente sinonimo de epizóotia no gado, porque si assim fosse, as epizootias seriam muito mais frequentes, como no sentido de indicar que a infecção do porco é primaria, pois para que fosse secundaria seria necessario que as epizootias em bovinos surgissem em muito maior número, disseminadas por toda parte, criando ocasiões favoraveis à disseminação do virus aos suinos. LOURENS (12), no foco holandês, fornece argumentos que nos parecem mais decisivos no mesmo sentido, quando escreve: "Está estabelecido que, no país, os porcos figuram em primeiro lugar como vectores. Em quase todos os casos observados nos bovinos, foi provado, com

certeza, que a doença havia grassado antes entre os porcos". Em outro ponto, o autor holandês volta a assinalar: "Oito a dez dias depois do aparecimento da doença no porco, ela pode ser observada nos bovinos". No foco epizootico de Bragança, que examinaremos em seguida, o aparecimento da doença no gado se verificou justamente cerca de 10 dias depois que as vacas de leite foram retiradas do pasto e colocadas no curral, em um regime provisorio de estabulação quase completa, para permitir um forrageamento mais intenso, que suprisse as deficiencias das pastagens, em consequencia da sêca. Há pois uma concordancia de dados indicando que o periodo de incubação da infecção natural deve ser em média de 10 dias e que a infecção dos suinos é primaria, em geral, embora possa ser secundaria, quando o porco ingere material virulento de bovinos.

Na tabela 10, na coluna relativa às inoculações feitas com 1 cc. de sôro, assinalamos separadamente os resultados na cobaia, traduzidos pela observação de sintomas típicos locais e pela presença de lesão. O sinal positivo repetido na indicação das lesões, caracterisa a presença de lesão extensa. Por aí se pode ter uma ideia das vantagens decorrentes do periodo de incubação regular e curto na cobaia, por via intramuscular, e do interesse da observação dos sintomas iniciais traduzidos por fisgadas na pata inoculada e contrações do membro correspondente. Algumas cobaias, com efeito, sucumbem a uma invasão rapida de virus, antes que uma lesão local consequente ao prurido se constitua. O exame, logo no início dos sintomas, permite surpreender indícios que não deixam dúvidas quanto à causa específica da morte.

A tabela 10 permite assinalar que um sôro que fornece resultado positivo com 1 cc. dá resultado identico com 0,5 cc. Aí se vê tambem que os sôros 66-68-69-70 são ainda ativos com 0.1 cc. O de n.º 68 é ainda neutralisante com 0.05 e 0.01. O de n.º 70 é ativo na dose de 0.1 e oferece uma proteção parcial nítida com 0.05, matando a cobaia com uma incubação de 10 dias e nenhuma proteção oferecendo com 0.01.

A tabela mostra ainda que todos os sôros ativos são de porcos adultos, com exceção do n.º 62, de 4-5 meses. Todos os novos, em número de dez, cuja idade oscila entre 1½ e 6 meses, são negativos.

A incidencia da infecção é pois, aquí, de 38.09%.

Setima serie: Foco de Bragança

As condições clinicas e epidemiologicas locais são, em linhas gerais, as mesmas de quase todos os outros focos. A doença só atinge um determinado lote de bovinos em condições especiais de criação, isto é, o gado de leite, que vem diariamente ao curral para cuidados, trato e ordenha. Esse lote, é constituido de 26 vacas de leite com 25 bezerros. No pasto está um efetivo de 60 cabeças de gado: vacas, novilhas, garrotes e bezerros.

No lote de gado de leite a doença apareceu em 26 de agosto em uma vaca, evoluindo este caso em 2 dias. No dia 27 apareceu um segundo caso, que evolue

TABELA 10

Exame dos sôros do foco de Bebedouro pela prova de proteção realizada na cobaia.

N.o dos sôros	Idade dos porcos	Doses de sôros incorporadas a 1 cc. de virus e 1 p. 10 contendo aproximadamente 250 D L M para a cobaia p. v. intramuscular					
		1.0 cc.		0.5	0.1	0.05	0.01
		Resultado	Sintomas e Lesão na cobaia	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
54	4-5 meses	+	+ ++				
55	adulto	—		—	+		
56 B	»	+	+ ++				
57 B	»	+	+ —				
58	4-5 meses	+	+ ++				
59 B	3 meses	+	+ +				
60	2 »	+	+ ++				
61	2 »	+	+ —				
62	4-5 meses	—		—	+		
63	1 ½ mês	+	+ ++				
64	2 meses	+	++	+			
65 B	adulto	+	+ +				
66	»	—		—	—	+	+
67	»	—		—	+		
68 B	»	—		—	—	—	—
69 B	»	—		—	—	+	+
70	»	—		—	—	+ 10 dias	+
71	6 meses	+	+ —				
72	2 »	+	+ —				
73	1 ½ mês	+	+ ++	+			
74	adulto	—		—	+		
Controles:							
Sôro argentino de peste		+		+	+	+	
V 1 sôro normal		+		+	+	+	+
V 2 » »		+		+	+	+	+
V 3 » »		+		+	+		

em 30 horas, e no dia 28 um terceiro, que é sacrificado. Nos dois primeiros casos a zona pruriginosa teve início na base da cauda, em torno do orificio anal e dos orgãos genitais externos. No terceiro caso uma vasta zona lesada pela coceira se estende desde a perna esquerda até a coxa e a garupa, alcançando uma faixa de 80 cms. de extensão por 30 de largura, com o aspecto impressionante que oferece o

couro depilado, escoriado, hipertrofiado, coberto de largas manchas de sangue. A região tem um aspecto entumescido, e um edema subcutaneo se forma, com acumulo de abundante serosidade amarelada.

Duas amostras de virus foram isoladas deste foco, da medula lombar dos dois casos únicos que autopsiamos, sendo as inoculações de cerebro, negativas. Aquí se encontra claramente explicada, mais uma vez, a causa de numerosos insucessos nas tentativas referidas na literatura, com o objetivo de isolar o virus. O material de autopsia recolhido é, em geral, pelo habito de rotina, à semelhança do que se pratica no caso da raiva, constituido de substancia nervosa de cerebro, isto é, principalmente de bulbo, corno de Ammon, cerebelo e zonas varias da cortex. E na doença de Aujeszky, com frequencia o virus não é encontrado no cerebro, sobretudo quando a zona de início do prurido que indica o ponto de penetração do virus, está localizada na região posterior do corpo, a mais distante do cerebro. Em trabalho anterior (2) nos ocupamos especialmente desta questão, para a qual encontramos aquí mais uma confirmação valiosa, porque procede de casos de infecção natural.

O gado que vive exclusivamente no campo, sem contato com o curral ou com a séde da fazenda, não é atingido pela doença, Aquí aparece, de modo muito nítido, mais uma vez, o papel indiscutivel do curral como o meio em que tem origem a infecção do gado. Pode-se afirmar, pelo exame de todos os focos até agora examinados, que a peste de coçar não é uma doença de estábulo, nem de campo, mas nos focos brasileiros, nitidamente uma doença do curral.

No foco de Bragança há uma circunstancia especial que reforça o valor deste conceito: o Estado de São Paulo todo atravessava, em agosto de 1940, longo periodo de uma sêca intensa e, como consequencia da ausencia de pastagens, o gado leiteiro passou a ser conservado preso no curral, durante a noite, para forrageamento com cana. Cerca de 8-10 dias depois que essa providencia foi tomada a doença irrompe na criação, em uma fazenda onde nunca havia sido verificada, segundo informes do proprietario que alí reside há mais de 35 anos!

Os fatores a serem considerados no caso seriam porcos, aves, ratos. Estes não foram examinados, dada a dificuldade de conseguir exemplares, pois as ratoeiras nem sempre dão os resultados desejados em locais em que o rato encontre abundancia de alimento nos paióis. Mas na epidemiologia da infecção e conforme a interpretação de SHOPE, que as observações epidemiologicas no nosso meio parecem não contrariar, o papel do rato deve ser antes indireto.

Em relação às aves, um exame preliminar de sôros de algumas, provenientes do Instituto, mostrou que eles nenhuma ação neutralisante exercem sobre o virus. Os raros exemplares de aves domesticas existentes na sede da fazenda eram algumas galinhas e sete frangos. Os sete ultimos forneceram sôros que, examinados 15 e de novo 40 dias depois ocorrência do foco, deram resultados negativos.

No concernente a porcos, a fazenda possuia um total de 40 cabeças, sendo 18 porcas, 6 leitões de 3-4 meses, 6 de mês e meio e 8 novos, de cerca de um mês. Foram examinados sôros dos seis leitões de 3-4 meses, do lote que, nas condições locais, podia ser mais responsabilizado. A sangria foi realizada 15 dias depois do aparecimento do primeiro caso e 10 depois de uma serie de seis casos em bovinos. Os

TABELA 11

Ensaios com sôros de leitões do foco de Bragança

Sangria: 15 dias depois do aparecimento do surto no gado

N.º dos sôros do foco de Bragança	Doses de sôros incorporadas a 1 cc. de virus e 1 p. 10 correspondendo a 100 mg. de virus e 250 D L M para a cobaia			
	1 cc.	0.5	0.1	0.05
	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
75	+			
76	+			
77	—	—	+	+
78	—	—	—	—
79	+			
80	—	—	—	
Controles:				
Sôro peste argentino	+			
H - porco normal		+	+	+
Sôro rato normal	+			

resultados estão na tabela 11, onde se verificam tres sôros ativos. O sôro da vaca n.º 2, colhido no momento em que foi sacrificada, não revelou ação protetora.

*

* *

A exemplo do que tem sido verificado em experiências com outras doenças produzidas por virus, conforme refere ANDREWES (1) e havia sido já assinalado por MARIE (14), no estudo da raiva, SHOPE obtem resultados identicos com os sôros examinados, quando conserva as misturas por um determinado periodo à temperatura ambiente e na geladeira, ou quando inocula as misturas logo depois de preparadas. Assinalam MANNINGER e MARCIS (13) resultados da mesma ordem quando realizam a mistura virus-sôro na seringa de inoculação. A in-

cubação das misturas pode, pois, ser desnecessaria. Apesar disso, na rotina de ensaios deste genero, quase sempre se realiza uma conservação previa do material à temperatura ambiente e na geladeira.

Uma experiência realizada nesse sentido nos forneceu resultado identico. Trabalhamos com 5 sôros, provenientes do foco de Bebedouro. Todos haviam revelado, anteriormente, poder neutralisante nítido e a tabela 12, cujos resultados podem ser confrontados com os dos mesmos sôros da tabela 10, mostra concordancia de resultados, com exceção apenas em um caso.

TABELA 12

Ensaio de neutralisação imediata com sôros do foco de Bebedouro

N.º do sôro	Virus 1p. 10	Sôro	Cobaia	Resultado
55	1 cc.	1 cc.	89	+ 2 1/2 dias
62	»	»	90	—
68	»	»	91	—
69	»	»	92	—
74	»	»	93	—
Controles:				
V 1	1 cc.	1 cc.	94	+ 2 1/2 dias
V 2	»	»	95	+ »

Com o objetivo de examinar a infecção experimental no porco, alguns leitões foram inoculados por via subcutanea. Damos aquí o resumo de um caso cujo sôro foi examinado, em seguida a uma serie de inoculações: um leitão recebe, em tres meses, quatro inoculações por via subcutanea, de doses crescentes de 1-2-3-5 cc. de emulsão a 1 p. 10 de cerebro de coelhos. A sangria é realisada 20 dias depois da ultima inoculação. Pela prova de proteção na cobaia, o sôro fornece os resultados da tabela 13, protegendo na dose de 0.05 contra 250 D L M.

TABELA 13

Experiências com o sôro de um leitão inoculado varias vezes por via subcutanea.

Cobaias	Virus 1p. 10	Sôro porco inoculado	Resultado
5.045	1 cc.	1.0	—
46	»	0.5	—
47	»	0.2	—
48	»	0.1	—
49	»	0.05	—
Controles:		Sôros normais:	
5.020	1 cc. 1p. 20		+ 70 - 72 horas
43	1 cc. 1p. 10	1.0	+ 50 - 70 »
44	» »	1.0	+ » »

DISCUSSÃO

Algumas observações de ordem geral, devem ser registradas incidindo sobre o exame em conjunto, das experiências aquí reunidas e como consequencia, sobre os resultados que delas decorrem:

I — Nas primeiras series, alcançando os quatro primeiros focos, com 34 sôros, os resultados são quasi todos positivos, o que traduz a presença de uma infecção que atingira já todo o lote, no momento em que os exames foram praticados. Há nestas series, — Laranjal, Cravinhos e Gironda, — um traço comum de condições de experiência, que explica a presença da infecção generalisada, atingindo o lote inteiro que foi objeto de exame: as sangrias se realizaram em um momento distante da época em que o foco em bovinos surgira e desse modo se explica por que os porcos de cada lote, conservados mais ou menos juntos, no foco, ou no laboratorio, tiveram oportunidade de contrair a infecção.

Esta interpretação encontra alicerce no carater altamente contagioso da infecção nos suinos, ao contrario do que geralmente se verifica nas outras espécies, noção fundamental que decorre dos ensaios de SHOPE (27-28) em condições experimentais, e das observações de KÖVES e HIRT (10-11) em condições naturais.

II — Por outro lado, nas ultimas series de sôros, — Sertãosinho, Bebedouro e Bragança, — de um modo geral, os exames foram feitos mais cedo. Os porcos puderam ser removidos dos focos para o laboratorio mais rapidamente e houve um intervalo bem mais curto entre o aparecimento do surto epizootico no gado e o momento da sangria. Desse modo, no caso destas ultimas series de sôros, deve-se admitir que, ou a propagação da infecção a todo o lote, na séde da fazenda, foi interrompida pela sua retirada do local, ou, ainda, que a infecção continuou a se propagar, mas a produção de anticorpos revelaveis pela técnica de trabalho não se havia ainda realizado. A associação destes dois fatores explica por que, nos ultimos focos, a incidencia da infecção é, em geral, mais baixa, caindo, em média, a um terço de cada lote examinado.

De fato, admitindo-se que antes de surgir o foco em bovinos ou no momento em que este se instalou os porcos fossem contagiantes, infectando o gado e disseminando o virus entre outros porcos ainda sãos, — si a sangria foi realizada mais cedo do que nos primeiros focos examinados, ela pode ter alcançado justamente um periodo em que a produção de anticorpos não é revelada, pois SHOPE assinala o seu aparecimento em um caso, a partir de 13 dias depois da infecção, e HIRT tem resultados negativos depois de 14 dias da infecção. Esses dados

indicam que deve estar por aí o limite do aparecimento de anticorpos no sôro de suinos.

Recentemente, inoculamos dois leitões por via subcutanea, com 3 e 5 cc. respectivamente, de uma emulsão virulenta de cerebro de coelho a 10%; uma sangria de ambos, realizada 24 dias depois da inoculação, nos forneceu sôros de fraco poder protetor: ambos neutralisavam 1 cc. de virus a 1 p. 10 em presença de 1 cc. e 0.5 cc. de sôro. Com 0.1 e 0.05 de sôro as cobaias não eram protegidas. As tabelas anteriores mostram como na infecção natural se encontram, com facilidade, sôros mais ativos.

Alem disso, si é exato, conforme decorre dos ensaios de SHOPE no laboratorio, e das observações de KÖVES e HIRT, em condições naturais, que o contagio se propaga logo rapidamente numa porcada, deve-se considerar que essa conclusão resulta de verificações em efetivos de suinos reunidos em local pequeno, em promiscuidade estreita, o que não se verifica em algumas de nossas criações no interior do Estado, onde o efetivo é mantido livre, em grandes mangueirões, ou solto no pasto. E' possivel, que, nessas condições, o contagio não se realise tão depressa nem com a mesma facilidade.

III — Conforme assinalamos, fizemos algumas tentativas de isolamento do virus diretamente do porco, seja recolhendo mucosidade nasal por lavagem da cavidade com agua fisiologica, seja por autopsia de alguns porcos e inoculação de triturado de orgãos no coelho. Apenas registramos resultados negativos. O fato não parece surpreendente senão de modo aparente e à primeira vista. A explicação para esses resultados negativos deve ser encontrada, em parte, no momento tardio dos ensaios, quando cessa o periodo de eliminação de virus e, em parte, no fato da colheita do material no local do foco não oferecer segurança, em vista da lavagem nasal se fazer com agua fisiologica e decorrer um periodo de conservação do lavado nesse veículo. A maioria dos materiais de autopsia que serviu às inoculações, e elas não foram numerosas, só pôde ser obtida tarde e deve ter alcançado um periodo em que o virus desapareceu do organismo.

Sobre esse assunto os dados de literatura são pouco numerosos, e ainda não se reuniram resultados de ensaios seriados, relativos à persistencia do virus no organismo dos animais depois da infecção, como portadores, nem à eliminação do virus. Os unicos ensaios nessa direção registra-os SHOPE (27-28), em condições experimentais, pela pesquisa do virus na mucosa nasal de suinos, e constam de duas series de experiências, com cinco porcos para cada serie.

Na primeira serie, o virus é procurado no lavado nasal por inoculações no coelho; resultados positivos são verificados em conjunto, durante um periodo variavel de 2 a 11 dias. Assim, o porco 1469 fornece dois resultados positivos, verificados no 6.º e 7.º dia depois da infecção experimental e nove resultados negativos; por outro lado, o de n.º 1482 fornece onze resultados positivos, do 5.º dia depois do contacto até o 15.º dia, contra quatro negativos.

Na segunda serie, o virus é procurado na mucosidade nasal por infecção direta do coelho, isto é, por fricção do focinho do porco contra a pele do coelho escarificada; aquí, enquanto o porco 1509 fornece apenas um resultado positivo, no 16.º dia de infecção, contra 12 resultados negativos, do 4.º ao 15.º dia, já o porco 1495 fornece nove resultados positivos, eliminando o virus do 4.º ao 12.º dia, de modo quasi constante, durante 9 dias.

O periodo contagiante resultante dessas duas series, tomado nos seus limites extremos, deve estar, assim, do 3.º ao 16.º dia. Esse periodo é, pois, verificado de modo muito nítido, em condições experimentais, mas a eliminação é irregular e alcança o periodo medio de uma semana, coincidindo com o periodo febril.

Si os unicos ensaios nesse sentido se confirmarem, mostrando resultados uniformes e indicando que o periodo de contagio do porco é muito nítido, porem mais ou menos curto e irregular, parece estar aí uma explicação para o carater esporadico e passageiro com que se apresentam os surtos em bovinos.

Tentando realisar uma esquematisação, praticamente, as cousas se passariam na natureza mais ou menos do seguinte modo:

Ha um periodo em que a infecção se instala e se propaga logo no efetivo de porcos. O periodo contagiante da porcada alcança um maximo que deve durar uma semana, quinze dias, ou talvez um pouco mais. Como consequencia, acidentalmente, o contacto dos bovinos com os suinos faz com que o contagio se propague aos primeiros. Alguns desses contraem a doença e morrem. Cessando o periodo de contagio do porco, nas condições normais, o contagio aos bovinos cessa do mesmo modo, e o surto epizootico é automaticamente cortado.

Assim se explicaria um carater essencial e estranho das epizootias nos focos brasileiros: a doença não se instala nunca, com carater enzootico em uma propriedade, mas irrompe, com uma característica brutal de alarmente subitaneidade, como se fosse logo dizimar todo o gado, e desaparece de modo imprevisto, com a mesma rapidez com que surgira, depois de liquidar 5-10-20 cabeças. Tudo isto se passa durante um periodo de 15-20 dias, desde o aparecimento do primeiro ao do ultimo caso em bovinos.

As caraterísticas clinicas, aparentemente tão obscuras e inexplicaveis, que cercam o aparecimento, o desenvolvimento e o desaparecimento dos surtos epizooticos da doença em bovinos, no foco brasileiro,

são assim interpretadas quando aí se introduz um fator unico e essencial, que é o porco, acompanhado das indicações importantes e muito especiais, com que a infecção e a doença se manifestam nesta espécie animal.

Os argumentos contrarios a esta interpretação do papel do porco quando examinados de perto, não resistem à análise. Pelo contrario, quando este fator é introduzido nos focos epizooticos, os argumentos e dados de ordem clinica, epidemiologica, estatística, ou sanitaria assim como os de distribuição geografica, são todos acordes no sentido de conserva-lo. Em outro trabalho nos alongaremos sobre esse assunto e reuniremos observações colhidas de inqueritos locais nos focos, tendendo sempre a responsabilisar o porco pela origem das epizootias nos bovinos.

O porco explica mesmo a profilaxia automatica, que ás vezes se realiza nos focos, quando, na ausencia de dados positivos, por indicação técnica, sem nenhuma explicação, ou de iniciativa propria, o criador mudava de pasto os animais. Diante dessa providencia, o que em geral acontecia até agora, é que o criador, em desespero de causa, isolava, em um pasto distante, o efetivo em que a doença se manifestara, e realizava assim, sem conhecimento de causa, a interrupção da corrente de contagio do porco ao bovino.

* * *

O resultado geral, em 80 sôros examinados, reunidos na tabela 14, permite assinalar 49 resultados positivos, o que indicaria uma incidencia aproximada de 60% para a infecção dos suinos.

TABELA 14

Resultado geral dos exames de sôros de porcos, pela prova de proteção na cobaia, em sete focos da doença em bovinos

Focos	Efetivo de suinos em contacto com bovinos	N.º de sôros de porcos examinados	N.º de sôros positivos
1 - Laranjal	25 leitões	9	9
2 - Pirajú		4	2
3 - Cravinhos	45	12	10
4 - Gironda	80	9	9
5 - Sertãosinho	300	19	8 42%
6 - Bebedouro	60	15	6 } 38%
»	20	6	2 }
7 - Bragança	40	6	3

Como já assinalamos, esse índice geral exige reparos que permitam interpretação do seu justo valor. Assim, alguns lotes foram sangrados muito depois da ocorrência do foco e não era possivel dispor

de instalação individual para isolamento dos animais, que impedisse a propagação da infecção de porco a porco, realizada já fora do ambiente epizootico.

Tomando porem, em consideração, isoladamente, as ultimas series de sôros, dos focos de Sertãosinho, Bebedouro, Bragança, nas quais o transporte para o laboratorio e a sangria se realizaram logo depois do aparecimento do surto, parece que se pode aceitar, sem grandes probabilidades de erro, que esses resultados devam traduzir o índice medio de infecção dos suinos nos focos e no momento das epizootias.

A incidencia da infecção nos suinos conclue-se, pois, é variavel e depende do momento em que os ensaios são realizados. Si um inquerito, pela prova de proteção dos sôros na cobaia, é feito no inicio da epizootia, tem-se um índice aproximado de 40%. Si os exames são realizados tardiamente, depois que a epizootia passou, a incidencia deve ser mais alta e pode alcançar 80-90% do efetivo, senão todo ele.

Comparando os dados aqui reunidos e as conclusões que deles decorrem, com os dados hoje classicos, da literatura moderna do assunto, relativos ao grau de disseminação da infecção no porco, dados que resultam dos inqueritos de SHOPE, realizados em condições diversas das nossas, mas por meio de técnica de trabalho identica, encontra-se uma concordancia significativa de resultados. Reforça-se assim a convicção de que estes ensaios traduzem a realidade.

Os dados reunidos, de epizootias no porco, no foco hungaro e no holandês, clinicamente examinadas de modo completo, têm do mesmo modo concordancia significativa de resultados no mesmo sentido, indicando disseminação larga do contagio. KÖVES e HIRT assinalam que a doença atinge, geralmente, 30 a 80% do efetivo e que se observam contaminações que alcançam 90 a 100% da criação. No foco holandês, LOURENS obteve outros dados na mesma direção, embora em epizootias mais benignas.

Pode-se, por isso mesmo, afirmar que, nos focos brasileiros da doença de Aujeszky, no momento das epizootias em bovinos, ou em seguida ao seu desenvolvimento, a incidência da infecção no porco é sempre elevada, alcançando 40% no inicio e depois 80% do efetivo, senão todo ele. Sob esse aspecto a alta incidência da infecção no porco é pois uma característica geral, em todos os focos examinados na Europa, nos Estados Unidos e agora no Brasil, embora variem as condições de trabalho e os métodos gerais de inquerito que foram utilizados para permitir fixar esta mesma conclusão geral.

CONCLUSÕES

1 — Em numerosos focos da doença de Aujeszky, surgidos no Estado de São Paulo, nesses ultimos anos, e observada sob a forma de casos em serie em bovinos, verifica-se, de modo impressionante, que a criação em que a doença se desenvolve está em contacto permanente ou mais ou menos frequente, no curral, no pasto, ou no mangueirão, com efetivos de suinos. Esta característica é importante porque é constante em todos os focos.

2 — O estudo seriado dos sôros de lotes de porcos sangrados em seguida ao aparecimento da doença em bovinos, revela, de modo igualmente constante, a presença de anticorpos neutralisantes do virus, pela prova de proteção realizada na cobaia, por via intramuscular.

3 — Em 80 sôros examinados, procedentes de sete focos diversos, surgidos em varias regiões do Estado, a incidência da infecção dos suinos é, de um modo geral, invariavelmente alta: a média de incidência pode ser tomada, aproximadamente, como sendo de 60% do efetivo examinado.

4 — Nos lotes de porcos sangrados algum tempo depois da ocorrência do foco, a incidência alcança todo o efetivo examinado, o que leva a admitir que a propagação do contagio continuou a se realizar depois que o lote deixou o foco.

5 — Nos lotes sangrados mais cedo, 15-20 dias depois que a doença apareceu no gado, a incidência de sôros ativos é significativamente mais baixa e alcança, em média, 40% do efetivo examinado.

6 — A presença desses anticorpos, de modo nítido e ás vezes a um titulo alto, pode ser verificada, ás vezes, até 6 meses depois que o foco epizootico apareceu nos bovinos, indicação que permite a reconstrução retrospectiva da origem do surto epizootico.

7 — Uma rotina segura e facil é realizada para esses ensaios usando-se a via intramuscular na cobaia. A via subcutanea é de patogenicidade irregular, mesmo para as misturas feitas com sôros normais. Os ensaios na cobaia foram feitos com 1 cc. de emulsão de virus e 1 p. 10, correspondente a cerca de 250 D L M para a cobaia, em presença de 1- 0.5 — 0.1 e mesmo 0.05 e 0,01 cc. de sôro.

8 — Com numerosos sôros, ensaios paralelos, nas mesmas condições, realisados na cobaia e no coelho, não fornecem resultados sempre identicos: um sôro neutralisante, por inoculação da mistura na cobaia, não fornece o mesmo resultado no coelho. Esta diferença deve ser explicada pelas experiências de SHOPE e de SABIN.

9 — Por inoculações em serie, por via subcutanea no porco, foi obtido um sôro neutralisante que na dose de 0.1 e 0.05 protege a cobaia contra 250 D L M.

10 — A infecção do porco, embora possa aparecer como secundaria, deve ser em geral primaria e não decorrente da doença no gado. Entre outras indicações nesse sentido deve ser retida a que resulta da presença da infecção no porco em um foco em que a doença não foi verificada em bovinos.

11 — A incidência elevada da infecção no porco e sua constancia em sete focos examinados, aliadas a uma serie de dados clinicos e epidemiologicos de inqueritos nos focos, levam à conclusão de que o porco é um portador de virus nos focos brasileiros e o responsavel pelo aparecimento das epizootias em bovinos.

12 — A epidemiologia da doença de Aujeszky, examinada em surtos diversos, na região que é o maior foco epizootico conhecido, não se afasta dos dados que a observação e a experiencia reuniram no foco norte-americano. Este carater de generalidade e de uniformidade, alem de confirmar e ampliar noções adquiridas por SHOPE, permite a convicção de que os resultados e as conclusões aquí reunidas traduzem a realidade.

13 — Dados de ordem clinica e epidemiologica de inqueritos *in loco*, responsabilizando o porco como fator de contagio são fornecidos; outros serão reunidos em outro trabalho.

14 — Os ensaios de inoculação das misturas virus-sôro sem incubação prévia, fornecem os mesmos resultados.

*

* *

Deixamos aquí registrados os nossos agradecimentos ao dr. C. Xavier, do Serviço de Defesa Sanitária Animal do Instituto, pelo excelente concurso notificando focos da doença e realizando autópsias para isolamento do virus.

AUJESZKY'S DISEASE IN SWINE THROUGH RESEARCHES OF NEUTRALISING ANTIBODIES OF THE VIRUS AFTER OUTBREAKS IN CATTLE IN BRAZIL

Abstract

The data collected in this country and its comparison with those from the literature, show that Brazil is to be considered Aujeszky's disease greatest center. Over 60 outbreaks were verified in the state of São Paulo and 21 strains of virus were isolated.

The researches in numerous centers revealed the facts that the disease is found only in cattle, and the outbreaks occur in herds whose contact with swines in barns and yards is more or less frequent. In cattle living only on pastures, in the same farms, the disease do not appear. Aujeszky's is not a disease of pasture or stable living cattle, but it is characteristic of cattle living in yards.

Researches were made in several centers in order to detect the infection in swines after outbreaks in cattle. Eighty sera of pigs, from seven different centers, were examined through the research of neutralizing antibodies of the virus. Forty nine positive results (about 60%) were obtained, thus showing that the infection is very prevalent in pigs.

Pigs infection should be considered as a primary one rather than consequent to the outbreaks in cattle.

A review concerning neutralizing antibodies of Aujeszky's virus is presented. Data on the materials and methods of work are recorded.

In numerous sera of pigs differences in the results, when the inoculations were made on rabbits and guinea pigs, were found.

A neutralizing serum was obtained under experimental conditions, which in doses of 0.05 cc. afforded protection to guinea pigs against 250 MID through intramuscular route.

The frequency of the infection in pigs leads to the conclusion of their being virus carriers and vectors of the disease to cattle. Complementary clinic and epidemiological data are assembled and discussed.

Aujeszky's disease epidemiology in Brazil is not far from data obtained in Shope's observations and experiments in the North American center. The data here recorded point to the same direction.

BIBLIOGRAFIA

1 — ANDREWES, C. — 1928 — The action of immune serum of vaccinia and virus III in vitro. *J. Path. Bact.*, 31, 671-698.

2 — CARNEIRO, V. — 1938 — Sobre a ausencia do virus da doença de Aujeszky no cerebro dos animais. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, **9**, 233-252.

3 — CARNEIRO, V. — 1939 — Anticorpos neutralisantes do virus da doença de Aujeszky em sôros de porcos no Brasil. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, **10**, 305-312.

4 — CARNEIRO, V. — 1940 — A cobaia no estudo experimental da doença de Aujeszky. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 11, 97-106.

5 — GERLACH, F. und SCHWEINBURG, F. — 1935 — Experimentelle Untersuchungen über die Aujeszkyschen Krankheiten. *Zeit. f. Infek.-Krankheiten*, **50**, 84-128.

6 — GLOVER, R. — 1938 — An examination of pig sera for neutralising Antibodies against the v. of Aujeszky's Disease. *The Vet. Rec.*, 50, 377-380.

7 — HART, F. — 1938 — Suspected Aujeszky's Disease in Cattle. *The Vet. Rec.*, 50, 382-383.

8 — HARVEY, F. and REID, J. — 1938 — Suspected "Mad Itch" in Cattle. *The Vet. Rec.*, 50, 268-270.

9 — HIRT, G. — 1937 — Über die das Virus der Aujeszkyschen Krankheit neutralisierenden viruliciden Sera. *Arch. f. wissenschaftliche u. prakt. Tierheilk.*, 72, 79-88.

10 — KÖVES, J. — 1935 — La maladie d'Aujeszky. *Bull. Off. Int. Epz.*, 10, 241-272.

11 — KÖVES, J. und HIRT, G. — 1934 — Über die Aujeszkysche Krankheit der Schweine. *Arch. f. wissenschaftliche u. prakt. Tierheilk.*, 68, 1-23.

12 — LOURENS, L. — 1935 — La maladie d'Aujeszky. *Bull. Off. Int. Epz.*, 10, 199-240.

13 — MANNINGER, R. und MARCIS, A. — 1937 — Versuche mit dem Erreger der Aujeszkyschen Krankheit. *Zeitschrift f. Infektionskrankheiten*, 51, 25-32.

14 — MARIE, A. — 1905 — Recherches sur le sérum antirabique. *Ann. Inst. Pasteur*, 19, 1-8.

15 — M'CORNY, P. — 1938 — Suspected Aujeszky's Disease. *The Vet. Rec.*, 50, 454-455.

16 — REMLINGER, P. et BAILLY, J. — 1934 — Contr. à l'étude du v. de la mal. d'Aujeszky. *Ann. Inst. Pasteur*, 52, 361-405.

17 — REMLINGER, P. et BAILLY, J. — 1938 — *La maladie d'Aujeszky*. 1 vol. 204 p. Masson et Cie. Paris.

18 — SABIN, A. — 1934 — Studies on the B. virus. *British J. Exp. Path.* 15, I — 248-268; II — 268-279.

19 — SABIN, A. — 1934 — The immunological Relationships of pseudorabies. *British J. Exp. Path.* 15, 372-380.

20 — SABIN, A. — 1936 — The protective action of nasally instilled imune serum against infection with certain neurotropic viruses by way of the nose. *J. Exp. Med.*, 63, 863-876.

21 — SABIN, A. — 1936 — IV — The nature of the varying protective capacity of antiviral serum in different tissues of the same species and in the same tissues of different species. *British J. Exp. Path.*, 16, 169-180.

22 — SABIN, A. and HURST, W. — 1935 — Studies on the B. virus. *British J. Exp. Path.*, 16, 133-148.

23 — SABIN, A. and WRIGHT, A. — 1934 — Acute ascending myelitis following a monkey bite, with the isolation of a virus capable of reproducing the disease. *J. Exp. Med.*, 59, 115-136.

24 — SHOPE, R. — 1930 — "Mad itch" of cattle. *Science*, 72, 559.

25 — SHOPE, R. — 1931 — An experimental study on "mad itch" with special reference to its relationship to pseudorabies. *J. Exp. Med.*, 54, 233-248.

26 — SHOPE, R. — 1932 — Identity of the virus causing "Mad itch" and pseudorabies. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 30, 308.

27 — SHOPE, R. — 1934 — Pseudorabies as a contagious disease in Swine. *Science*, 80, 102-103.

28 — SHOPE, R. — 1935 — Experiments on the epidemiology of pseudorabies. *J. Exp. Med.*, 62, 85-99.

29 — SHOPE, R. — 1935 — Experiments on the epidemiology of pseudorabies. *J. Exp. Med.*, 62, 101-117.

———o———

Vol. 12 — Art. 19 Novembro de 1941

O DIAGNOSTICO HISTOLOGICO DA PESTE SUINA
COM REFERENCIA ESPECIAL ÁS ALTERAÇÕES PULMONARES

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 49-51

O diagnostico da peste suina pela pesquiza histologica das alterações organicas tem sido objéto de estudo para uma serie de pesquizadores que têm procurado determinar em certos achados, caracteristicos especificos para o processo pestoso.

Dentre os resultados das varias pesquizas histologicas levadas a efeito, mereceram, sem duvida alguma, lugar de destaque, as de RÖHRER (10) e SEIFRIED e HERBSTREITH (17), que estudaram detidamente e indicaram como meio de diagnostico as alterações das paredes vasculares dos ganglios linfaticos, representadas histologicamente por tumefação e proliferação das celulas endoteliais, hialinização, degeneração gordurosa, trombóse e mesmo necróse das paredes de capilares. Embora tenha sido demonstrado mais recentemente pelo proprio SEIFRIED (13) que essas lesões não são especificas da peste e podem aparecer tambem em outras infecções, elas têm na verdade real valor como pesquiza complementar e permitem em grande numero de casos o estabelecimento de um diagnostico seguro. Não sómente essas lesões dos vasos, mas outras alterações ganglionares, tais como proliferação das celulas reticulares, ás vezes hiperplasia do tecido linfoide, hemorragias intraparenquimatosas nas porções pobres em celulas, e necróses, achados esses bem estudados por NIEBERLE (9), RÖHRER (10), SEIFRIED e CAIN (16), servem tambem de complemento para a elucidação do diagnostico, embora não possam ser considerados como sinais patognomonicos.

As alterações vasculares não são, no entanto, restritas aos ganglios linfaticos. As paredes dos vasos, principalmente dos capilares de todos os orgãos e tecidos restantes, sofrem as mesmas modificações, constituindo assim o estudo, ou melhor, a pesquiza dessas lesões nos varios outros segmentos do organismo, outros pontos de reparo para o estabelecimento do diagnostico (SEIFRIED e CAIN (16)).

Particularmente nitidas são as alterações vasculares do baço, estudadas por DAVID e SCHWARZ (3), RÖHRER (10) e por SEIFRIED e CAIN (16), representadas por degeneração hialina, necróse e trombóse

das arterias foliculares, determinando o aparecimento de infartos anemicos, que seriam caracteristicos para a doença.

No rim, as lesões dos vasos que causam hemorragias nos espaços interlobulares e nos glomerulos, seriam, segundo observações de LÜTTSCHWAGER (7), RÖHRER (11) bem como de SEIFRIED e CAIN (16), base para o reconhecimento da peste suina. O valor dessas alterações renais como meio de diagnostico foi no entanto contestado por HAIDINGER (5), que as considerou como não sendo especificas e podendo ocorrer em outras doenças infecciosas.

Em casos de doença experimental WALDMANN (18) estudou cuidadosamente o desenrolar de todo o processo anatomo-patologico no trato intestinal e julga de importante significação as lesões que aí se desenvolvem. São consideradas como caracteristicas, no intestino delgado, as inflamações fibrinosas localisadas preferentemente no ileo, enquanto no intestino grosso são as necróses, as ulcerações, as formações difteroides e os conhecidos botões pestosos, que aparecem mais frequentemente.

As alterações histologicas no intestino são estudadas por WALKIEWICZ (19), tambem em casos experimentais; elas não podem no entanto ser consideradas como caracteristicas.

As lesões inflamatorias do sistema nervoso que se desenvolvem no decorrer da doença, e estudadas por varios pesquizadores como SEIFRIED (14), EBERBECK (4) e RÖHRER (10), foram por algum tempo consideradas como caracteristicas e mesmo de grande significação. São infiltrados vasculares e perivasculares (por linfocitos, mononucleares, plasmacelulas e ocasionalmente eosinofilos), proliferação de celulas da glia em torno de vasos ou em fórma de fócos inflamatorios, satelitismo, em alguns casos figuras de neuroniofagia, degeneração das celulas nervosas e hemorragias. Estudos posteriores, entre os quais os de RÖHRER e GRAF (12), demonstraram, porém, que essas alterações não são caracteristicas e que lesões de tipo mais ou menos identico podem ocorrer sob a ação de outros agentes que não o virus da peste.

Estudos anatomo e histopatologicos foram ainda levados a efeito em outros orgãos, como figado, anexos do aparelho urinario, suprarenal, péle, e varias lesões encontradas mais frequentemente foram consideradas por alguns como merecendo reparo do ponto de vista do diagnostico.

As alterações do pulmão não foram objéto de estudos cuidadosos dirigidos para a pesquiza de sinais caracteristicos que aí pudessem aparecer, segundo observações de WALDMANN (18), SEIFRIED e CAIN (16), (feitas respectivamente na Europa e nos Estados Unidos) em

virtude da inespecificidade ou da pequena ocurrencia de lesões consequentes á peste, neste orgão. Assim assinalam SEIFRIED e CAIN, depois de haver estudado em varios orgãos todas as modificações morfologicas decorrentes da peste: "os orgãos restantes, notadamente os pulmões, o coração, as glandulas endocrinas e a péle, não foram incluidos no exame de rotina porque em geral não são sédes de lesões tipicas nesta doença". Em casos experimentais, sómente em 5% deles WALDMANN encontrou lesões pneumonicas agudas e em uma unica vez pneumonia com caracter hemorragico. Acentua além disso não haver constatado, em nenhum caso, hemorragias subpleurais. (*)

Nossas observações, nitidamente diversas das relatadas por estes pesquizadores, mostram antes de tudo, de modo claro, de como certas influencias, entre as quais talvez esteja a do clima em primeiro plano, modificam de modo bem sensivel o quadro de doenças, ocorrendo em outras regiões com caractéres até certo ponto diversos.

Nas nossas pesquizas o encontro de casos de pneumonia pestosa tipica, numa porcentagem bem elevada, demonstra claramente o que referimos. Em 89 animais com diagnostico seguro de peste, encontrámos 56 vezes, ou seja em 62% dos casos, lesões caracteristicas de pneumonia pestosa. Em 21 outros casos assinalámos perturbações circulatorias intensas, hemorragias parenquimatosas ou subpleuraes e infartos hemorragicos, que, si não caracteristicos, constituem pelo menos achados que dão indicações mais ou menos seguras. Em 12 animais sómente, não foram encontradas alterações pulmonares.

A s a l t e r a ç õ e s p e s t o s a s d o p u l m ã o c o n s t i t u i r a m e m t o d o o m a t e r i a l e s t u d a d o o s a c h a d o s m a i s f r e q u e n t e s e m c o m p a r a ç ã o c o m a s l e s õ e s d o s d e m a i s o r g ã o s.

Devemos acentuar, por outro lado, que a pesquiza de lesões pulmonares da peste foram grandemente dificultadas aos diversos pesquizadores pela constante concomitancia de lesões de pneumonia gripal, que só recentemente puderam ser nitidamente distinguidas. Tanto é assim que KÖBE e SCHMIDT (6), ainda em trabalho relativamente recente, tratando do diagnostico diferencial entre peste crónica e gripe, não referem a possibilidade de utilização das alterações pulmonares como meio de reconhecimento da peste.

Nossas pesquizas recentes sobre a histopatologia da pneumonia gripal (1) as quais nos permitiram especificar até certo ponto qua-

(*) KERNKAMP, (*Lesions of hog cholera: Their frequency of occurrence. — J. A. V. M. A.* 1939 — 95 — 159-166) em pesquizas feitas em 286 suinos naturalmente infectados, refere o encontro de alterações inflamatorias do pulmão em 44,7% e de hemorragias em 25% dos casos. Esta observação, em completo desacordo com os achados dos autores citados aproxima-se das nossas verificações.

dros histologicos diversos, segundo o tipo da bacteria de associação, auxiliam grandemente o estabelecimento do diagnostico diferencial.

Nosso material foi obtido de casos espontaneos de peste, com periodos de evolução variaveis, desde as formas muito agudas até as de curso mais lento.

Passemos ao seu estudo e focalisemos em primeiro lugar:

a) achados macroscopicos.

Estes, em geral, apresentam caracteristicos que revelam nitidamente a natureza do processo.

Inicialmente devemos acentuar que não assinalámos preferencia de regiões para o assestamento dos processos inflamatorios, como se póde observar com a gripe, cujas alterações aparecem sempre nas porções mais anteriores do pulmão. O que se observa, com frequencia, é a superposição de lesões pestosas e gripais em virtude destas ultimas aparecerem em numero relativamente elevado de animais, mesmo tidos como normais. E' por esse motivo que julgamos dever ser tomada como regra a *preferencia das pesquizas dirigidas sempre para as lesões localizadas nas porções mais posteriores, que têm maior probabilidade de constituir alterações pestosas puras.* Estas pódem mostrar-se disseminadas em todo o pulmão ou em áreas mais ou menos extensas, aparecendo com maior frequencia nas porções medianas.

O quadro macroscopico encontrado foi, em geral, o de uma pneumonia purulento-hemorragica, ás vezes necrosante. As *alterações iniciais* são nas mais das vezes representadas por acentuada hiperemia e edema no parenquima e nos septos conjuntivos. Nesta fase já vimos frequentemente as hemorragias parenquimatosas e subpleuraes. Em alguns pontos já são perceptiveis áreas de hepatização, de côr vermelha pardacenta, com o aspéto de uma *pneumonia purulento-hemorragica.* Ainda como fazendo parte do quadro das perturbações circulatorias, devemos referir os infartos hemorragicos que aparecem, ás vezes pequenos, outras vezes grandes e nitidamente perceptiveis, principalmente na superficie do orgão.

Durante a *fase de estado* os processos inflamatorios tornam-se nitidamente acentuados. O quadro macroscopico é caracteristico da infecção pestosa. Áreas hepatisadas e de côr amarelada, em que os sinais da reação inflamatoria aparecem de modo nitido, mostrando-se em acentuado contraste ao lado de outras em que os processos congestivos e hemorragicos predominam, tendo de permeio os septos

conjuntivos fortemente dilatados por liquido seroso e transparente, dão ao orgão o aspéto tipico do denominado "pulmão marmóreo".

Os processos regressivos tendem a aparecer rapidamente nas áreas onde houve hepatização cinzenta, e que se tornam lógo séde de numerosos pequenos fócos de necróse, acompanhando de modo aparente o desenho lobular, como pequenos mosaicos. Estes, conforme observámos, têm tendencia a se confluir, dando formação a maiores áreas de necróse que, pelo esvasiamento em seguida á passagem do conteúdo para dentro de um bronquiolo, dão, algumas vezes, origem a pequenas cavernas. Os bronquiolos e pequenos bronquios contém sempre exudato de aspéto purulento. O aspéto macroscopico é então o de uma pneumonia necrosante.

É regularmente frequente o encontro de um exudato fibrinoso sobre a pleura (pleuriz fibrinosa) constituindo ás vezes pequenas e fracas sinequias com a pleura parietal nas porções correspondentes ás zonas inflamadas. Do mesmo modo não são raras as alterações inflamatorias pleuro-pericardiacas.

Vimos alguns casos de evolução sub-aguda. Nestes o pulmão mostrava, na superficie de córte, pequenos fócos de necróse circundados de porções um tanto induradas e fortemente hiperemicas.

Si bem que um diagnostico seguro nem sempre possa ser estabelecido pelas lesões anatomo-patologicas, estas, no entanto, constituem bases solidas que permitem em grande numero de casos o seu reconhecimento imediato.

Os casos duvidosos são a nosso vêr com facilidade e seguramente diagnosticados pelas pesquizas das

b) lesões histologicas

que constituem o objetivo principal das nossas indagações.

Descreveremos os achados microscopicos de acordo com o módo de evolução da doença, em fase inicial, de estado e de reação, aliás de maneira identica á empregada na descrição das lesões anatomo-patologicas.

Conforme pudemos constatar, constituem achados constantes nos estadios iniciais, a hiperemia muito acentuada de vasos maiores e dos capilares interalveolares, ao lado de edema, ás vezes intenso, aparecendo em grandes áreas do parenquima e com deposição de fibrina. As hemorragias consequentes á necróse de paredes vasculares são alterações de particular significação e foram encontradas muito frequentemente. Lesões intimamente ligadas a estas alterações degenerativas dos vasos são os infartos hemorragicos, representados histologicamente por extravasações sanguineas intensas, com tamponamento total das

cavidades alveolares e bronquiolares. (Estas alterações serão melhor estudadas posteriormente). As alterações do parenquima não são, nesta fase, restritas ás perturbações circulatorias, pois, sinais de uma reação inflamatoria já se fazem mostrar tambem desde o inicio. No interior dos alvéolos encontrámos, já nos periodos iniciais, além de hemacias, um exudato sero-fibrino-celular, sendo a parte figurada constituida por celulas epiteliais descamadas, tumefeitas e vacuolisadas, e por elementos de nucleo arredondado ou polimorfo e protoplasma mais ou menos abundante, com reação da oxidase negativa ou fracamente positiva; estas celulas são de caracter tipicamente histiocitario. Vimos alguns casos em que a descamação epitelial era particularmente intensa.

Os vasos linfaticos dos septos conjuntivos aparecem muito dilatados, contendo liquido transparente e celulas de tipo histiocitario (monocitos), ás vezes em grandes acumulos.

Conforme pudemos observar, as alterações bronquiais e bronquiolares são, na fase inicial, representadas histologicamente por uma descamação mais ou menos acentuada das celulas epiteliais que, conjuntamente com alguns elementos histiocitarios e sôro, constituem o exudato bronquiolar. Os espaços linfaticos da submucosa dos bronquiolos mostram-se sempre nitidamente dilatados.

Não devem ser consideradas como pertencentes ao quadro das alterações desenvolvidas pela ação do virus da peste as proliferações linfoides peribronquiolares muito frequentemente encontradas e que, como já está claramente demonstrado, dependem da infecção pelo virus da gripe.

Estas alterações que descrevemos como pertencentes á fase inicial, em que predominam as perturbações circulatorias, foram encontradas em casos de decurso rapido, consequentes, seja ao desenvolvimento dessas mesmas alterações em caracter muito agudo, seja em consequencia de lesões que atingiram outros orgãos de importancia vital.

Na maioria dos casos mais frequentemente observados, em que a doença teve um decurso mais lento, encontrámos alterações que descreveremos como pertencentes á fase de estado. E' nesse estadio que a pneumonia pestosa apresenta, de modo nitido, caracteristicas proprias e, portanto, bases para o estabelecimento de um diagnostico seguro. Neste ponto é que se torna necessario, para o estabelecimento do diagnostico diferencial entre pneumonia pestosa e pneumonia gripal, um conhecimento seguro das alterações proprias desta. Posteriormente trataremos desta parte diferencial. Passemos á des-

crição das alterações histologicas encontradas nesta fase de estado.

Devemos acentuar que, segundo nossas observações, o quadro histologico da pneumonia pestosa é caracterizado por uma intensa infiltração de histiocitos no parenquima, nos vasos linfaticos dos septos conjuntivos (monocitos), e no interior dos pequenos bronquios e bronquiolos.

No parenquima, o exudato é constituido principalmente por histiocitos (Estampa 49, fig. *A*), que infiltram massiçamente, de modo difuso ou em fócos, enchendo totalmente os alvéolos, cujas paredes não raro se rompem, dando origem a fócos inflamatorios mais ou menos extensos. Em outras áreas encontrámos o processo inflamatorio ainda em estadios menos adiantados, vendo-se então alvéolos cheios de sôro, com pequeno conteúdo celular, depositos de fibrina e áreas de hemorragia.

O infiltrado histiocitario tende, de modo mais ou menos rapido, a sofrer os processos de necrobiose. Ha picnose nuclear e desintegração do citoplasma. Observámos em grande numero de casos, que, nos pontos onde a infiltração histiocitaria fôra mais intensa, sem que se tenha dado o rompimento das paredes alveolares, o exudato celular, mesmo em desintegração, conserva o desenho alveolar, formando aspétos de mosaico semelhantes aos observados em casos de pneumonia mormósa (Estampa 49, fig. *B*).

Com o evoluir do processo, as partes centrais desses fócos, ás vezes bem extensos, chegam á necróse, enquanto nas porções perifericas ainda se vêm celulas conservadas (Estampa 50, fig. *C*). Um pequeno aumento mostra-nos, assim, nesta fase, o parenquima pulmonar semeado de numerosos fócos inflamatorios, ás vezes confluentes, constituidos por celulas (histiocitos) conservadas ou já em desintegração, tendo ao redor tecido pulmonar relativamente bem preservado, com sôro, fibrina, ás vezes hemacias e celulas epiteliais e histiocitarias no interior dos alvéolos.

Devemos agora ocupar-nos de outro tipo de alteração: os infartos, consequentes ás trombóses vasculares. Verificámos que em numerosos casos predominam sobretudo as alterações consequentes ás lesões vasculares e ás perturbações circulatorias. O quadro é caracterizado pelo aparecimento de multiplos infartos pequenos, muitas vezes confluentes, disseminados por toda a superficie do córte, que apresenta assim um aspéto marmorejado muito tipico, ao qual se póde denominar como uma "pneumonia multicôr" (Estampa 50, fig. *D*).

Histologicamente observámos áreas mais ou menos extensas, tendo em geral uma pequena arteria, e muitas vezes um bronquiolo, na parte central, ao lado de alvéolos totalmente cheios de hemacias e com as paredes rompidas (infartos hemorragicos) ou contendo depositos de fibrina e celulas, muitas das quais em necrobiose. Em torno dessas áreas aparecem densos valos constituidos por nucleos picnoticos, de origem histiocitaria (sequestro). As porções internas correspondentes a esses infartos tendem naturalmente á desintegração, meio onde a proliferação bacteriana se torna intensa, originando-se daí áreas de necróse e abcessos. As porções restantes do parenquima são séde dos processos inflamatorios semelhantes aos já descritos. Nestes casos é de interesse o estudo das alterações dos vasos, que em geral mostram acentuada degeneração hialina das paredes e trombóses parciais ou totais.

O s v a s o s l i n f a t i c o s d o s e s p a ç o s c o n j u n t i v o s participam intensamente do processo inflamatorio, tornando-se, em numerosos casos, extremamente dilatados. No seu interior vê-se liquido coagulado, transparente, fracamente corado, e grande quantidade de celulas de tipo histiocitario (monocitos).

A s l e s õ e s b r o n q u i a i s aparecem regularmente de modo muito nitido. Além de acentuada hiperemia dos capilares sanguineos, notámos sempre uma fórte dilatação dos espaços linfaticos da submucosa. Não foram raros os casos em que verificámos uma descamação total do epitelio, principalmente dos bronquiolos. Vimos alguns casos em que houve mesmo destruição da camada muscular peribronquiolar.

O conteúdo dos bronquiolos é constituido, nesses estadios já progressos, quasi exclusivamente de histiocitos e de raras celulas epiteliais. Estas, bem como as constituintes do exudato do parenquima, tendem, de modo mais ou menos rapido, a sofrer os processos de necrobiose. Ha desintegração do citoplasma, os nucleos tornam-se picnoticos e em casos de decurso mais prolongado encontra-se, na luz bronquial, um exudato necrotico.

Nos casos em que a doença evolue mais lentamente, em forma sub-aguda desenvolve-se a que denominamos, f a s e d e r e a ç ã o, na qual predominam os processos proliferativos tendentes á reparação das porções lesadas.

Tivemos oportunidade de observar essas alterações reparativas em 3 casos sómente. No parenquima observámos acentuada reação conjuntiva em todas as porções onde se desenvolveram processos inflamatorios. Em algumas áreas a proliferação de celulas conjuntivas era

de tal modo intensa, que fazia desaparecer totalmente a estrutura alveolar do pulmão.

Em torno das áreas de necróse era intenso o acumulo de nucleos picnoticos (histiocitos) que apareciam formando valos, ás vezes muito densos. Os pequenos fócos de necróse mostravam-se, uns totalmente invadidos por histiocitos enquanto em outros se percebiam ainda pequenas porções centrais em necróse, onde havia proliferação bacteriana (Estampa 51). Um grande aumento desses fócos mostrava, nas porções marginais, aspétos interessantes, formados pelos histiocitos que adquiriram formas estranhas e muito alongadas, ao tentar a penetração para as porções centrais em necróse.

Circundando os septos conjuntivos apareciam densos mantos celulares constituidos por histiocitos e celulas linfoides, formando ás vezes verdadeiros centros germinativos. Em alguns pontos dos septos a proliferação conjuntiva já se revelava de modo nitido, enquanto os vasos linfaticos estavam ainda muito dilatados e continham liquido coagulado de aspéto fibrinoso e grande numero de celulas de tipo histiocitario.

Os bronquiolos continham material necrotico e celulas histiocitarias de infiltração recente. Em alguns verificámos pequena proliferação conjuntiva.

Alterações pleurais — Sobre a pleura é frequente encontrar-se, em casos recentes, depositos de fibrina infiltrados por histiocitos, que aparecem substituidos por pequena reação fibrosa nos casos de evolução lenta.

Façamos um curto resumo das alterações observadas: Macroscopicamente, na fase inicial, verificámos sempre uma fórte hiperemia, edema e hemorragias ás vezes intensas. A fase de estado é representada pelo quadro do denominado "pulmão marmoreo" no qual se observam infartos hemorragicos, áreas de hepatização cinzenta e vermelha, ao lado de intenso edema dos septos. Áreas de necróse num estadio mais avançado.

Vimos casos de evolução sub-aguda nos quais as alterações eram representadas no parenquima por áreas de induração, pequenos fócos de necróse e fórte hiperemia.

O quadro histologico é caracteristico do processo pestoso. Na fase inicial verificámos que predominam as perturbações circulatorias (hiperemia, hemorragias, infartos e edema), enquanto as alterações inflamatorias propriamente ditas (infiltração histiocitaria) são de menor gráo. A descamação epitelial, (epitelio alveolar e bronquial), que aparece frequentemente, mostrou-se em alguns casos bem acentuada.

Uma acentuada infiltração de celulas de tipo histiocitario, no parenquima, e nos pequenos bronquios, ás vezes ao lado de infartos, caracteriza o quadro microscopico na fase de estado. Em estadios adiantados encontrámos, em numerosos casos, áreas de necróse.

Na fase de reação verificámos fócos de necróse, muitos dos quais totalmente invadidos por histiocitos, e nitida proliferação conjuntiva no parenquima.

Sobre a pleura aparecem depositos de fibrina, nos casos de evolução aguda, e pequena proliferação conjuntiva, em casos de decurso mais lento.

O VALOR DAS ALTERAÇÕES PULMONARES COMO MEIO DE DIAGNOSTICO DA PESTE SUINA

O conhecimento das alterações encontradas nos casos de pneumonia gripal são, como já acentuámos, de grande valor no estabelecimento do diagnostico diferencial com a pneumonia de origem pestosa, pois a possibilidade de confusão é sem duvida sómente possivel entre estes tipos de pneumonia, que ocorrem frequentemente em suinos.

As lesões macroscopicas de ambas permitem em geral um reconhecimento seguro ou pelo menos uma suspeita bem fundada; esta, no entanto, só poderá ser confirmada ou afastada pela pesquiza das alterações microscopicas.

As alterações anatomo-patologicas do pulmão, em casos de gripe, podem ser consideradas como caracteristicas. A localização das alterações nas regiões anteriores do pulmão, ou seja nos lobos apicais, medios, e em pequena parte dos posteriores, ao lado do aspéto e coloração pardacenta das porções lesadas, conduzem ao diagnostico de uma pneumonia de origem gripal.

Em estudos histopatologicos desta pneumonia conseguimos estabelecer que as alterações nela decorrentes nem sempre são semelhantes, apresentando-se com caracteristicas diferentes, variando com a bacteria de infecção secundaria. Assim, conseguimos determinar um tipo em que o exudato inflamatorio é composto quasi sómente por mononucleares e por celulas epiteliais descamadas, um outro tipo, em que só se encontram celulas de caracter histiocitario (em pequeno numero) e celulas descamadas do epitelio alveolar, e finalmente um terceiro tipo, em cujo exudato encontrámos leucocitos neutrofilos reunidos tambem a celulas epiteliais.

Na pratica, porém, nem sempre se encontram alterações tão bem definidas, pois a associação frequente de duas ou mais bacterias de infecção secundaria conduz naturalmente a uma modificação do quadro, que continúa entretanto, caracteristico da pneumonia gripal.

As lesões anatomo-patologicas da pneumonia pestosa permitem, na maioria dos casos, a conclusão de um diagnostico exáto. Deve ser notada a falta de preferencia de regiões do pulmão para o desenvolvimento das alterações inflamatorias. Estas, tanto podem aparecer nas porções anteriores sobrepondo-se muitas vezes ás alterações gripais, como nas porções posteriores, isoladamente, ou em ambos os pulmões.

O aspéto das alterações, nitidamente diferente do observado na gripe, constitue ponto de reparo de real valor. Áreas de hepatização vermelha, com hemorragias intensas, ao lado de zonas de côr pardacenta, ás vezes com fócos de necróse e edema acentuado dos septos conjuntivos, depõem claramente a favor da pneumonia de origem pestosa.

Consideramos o quadro histologico desta pneumonia, como caracteristico. A hiperemia muito acentuada, acompanhada de edema, hemorragias e infartos nos estadios iniciais, a descamação epitelial e a intensa infiltração de celulas de tipo histiocitario num estadio mais avançado, e por fim, as necróses, algumas vezes com tendencia á reparação, constituem alterações que devem ser julgadas capazes de servir, de modo indiscutivel, no estabelecimento de um diagnostico diferencial.

Estando já demonstrado, portanto, o valor real das alterações microscopicas como ponto de reparo para a elucidação do diagnostico, resta-nos agora considerar a vantagem da pesquiza das lesões pulmonares em casos de suspeita ou necessidade de confirmação no diagnostico da peste suina. Já referimos os resultados das pesquizas de varios outros autores quanto ás alterações dos diversos orgãos. As alterações renais e ganglionares já não seriam consideradas como patognomonicas do mesmo modo que as lesões assinaladas no sistema nervoso. Restam-nos, portanto, as alterações do trato intestinal, e do baço, como de maior importancia, e outras menos consideradas, como as dos anexos do aparelho urinario, do figado, etc., entre as que ainda não sofreram contestação como capazes de revelar a existencia do processo pestoso. Acreditamos que a inclusão das pesquizas das alterações pulmonares entre as que comumente são feitas em outros orgãos trará, sem duvida, resultados de valor. Por outro lado a apreciavel frequencia da pneumonia em casos de peste constituiria ainda mais um fator contribuinte para melhor aproveitamento das lesões como meio de diagnostico.

CONCLUSÕES

Segundo nossas observações, o pulmão é frequentemente séde de alterações inflamatorias consequentes á peste suina.

Estudos anatomo e histopatologicos de um numero elevado de casos de pneumonia pestosa demonstraram que as lesões histologicas, principalmente, são caracteristicas e permitem uma facil diferenciação da pneumonia de origem gripal.

A pesquiza dessas alterações pulmonares constitue, a nosso ver, complemento de real valor para o estabelecimento do diagnostico da peste.

THE HISTOLOGICAL DIAGNOSIS OF SWINE FEVER WITH ESPECIAL REFERENCE TO THE ALTERATIONS OF THE LUNGS

Abstract

Our observations allow the conclusion that the lungs frequently harbour inflamatory processes in consequence of swine fever.

Anatomical and histopathological researches in a large number of cases of swine fever pneumonia have shown that principally the histological lesions are characteristic and permit an easy differentiation from grippal pneumonia.

The circulatory disorders (hyperemia, hemorrhages, oedemas, infarcts) are predominating in the inicial phase of swine fever pneumonia, while the inflamatory alterations (histiocytarian infiltration) are present in a lesser degree. Desquamation of the alveolar and bronchial epitelium is frequent and sometimes well pronounced.

The stationary phase is microscopically characterized by a decided infiltration of the parenchyma and of the interior of the bronchioles by histiocytes, sometimes in connexion with infarts. Necrotic areas appear in more advanced cases.

In the reaction phase (cases of slow evolution) a clear connective proliferation occurs.

The research of such alterations constitutes, from our point of view, a complement of real value to the pest diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

1 — BUENO, P. — 1939 — Alterações histologicas do pulmão em face do virus da pneumonia contagiosa dos suinos. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 10, 291-300.

2 — CAIN, C. B. and SEIFRIED, O. — 1932 — Histological Studies on Hog Cholera. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 33. 225-228.

3 — DAVID, W. und SCHWARZ, M. — 1930 — Untersuchungen über Virusschweinepest. *Arch. Tierheilk.* 62. 315.

4 — EBERBECK, E. — 1935 — Zur Pathologie der Virusschweinepest. *Arch. Tierheilk.* 63, 371-400.

5 — HAIDINGER, H. — 1936 — Über die Verwertbarkeit der histopatologischen Veränderungen der Nieren zur Schweinepestdiagnose. *Vet. Med. Inaug. Diss. Wien.* (cit. Michalka).

6 — Köbe, K. und Schmidt, W. — 1934 — Differential - Diagnose zwischen chronischer Schweinepest und Ferkelgrippe. *D.T.W.* 42. 145-148 e 163-168.

7 — Lüttschwager — 1931 — Zur histologischen Diagnose der Virusschweinepest. *Arch. Tierheilk.*, 64. 236-244.

8 — Michalka, J. — 1937 — Der heutige Stand der Diagnostik und Immunotherapie der Schweinepest. *Ergb. der Hygiene.* 19. 127-177.

9 — Nieberle, K. — 1930 — Über das Wesen und die diagnostische Bedeutung der Lymphknotenveränderungen bei der akuten Schweinepest. *Berl. Tierärztl. Wschr.*, 2. 717-721.

10 — Röhrer, H. — 1932 — Histologische Untersuchungen bei Schweinepest. I — Lymphknotenveränderungen in akuten Fällen. II — Veränderungen im Zentralnervensystem in akuten Fällen. *Arch. Tierheilk*, 1931. 62. 345; 439. III — Veränderungen der Milz in akuten Fällen unter besonderer Berücksichtigung der Milzinfarkte. *Arch. Tierheilk.*, 64. 125-143.

11 — Röhrer, H. — 1932 — Pathologisch-anatomische und histologische Studien bei akuter Schweinepest, insbesondere an Leber und Niere. *Virchow's Archiv.* 284. 203-230.

12 — Röhrer. H. und Graf, A. — 1934 — Die Bedeutung des "selbständigen encephalitischen Symptomenkomplexes" für die histologische Diagnose der chronischen Schweinepest. *D. T. W.* 42. 637-643.

13 — Seifried, O. — Cit. Michalka.

14 — Seifried, O. — 1931 — Histological Studies on Hog Cholera. I — Lesions in the Central Nervous System. *J. Exp. Medicine.* 53. 277-287.

15 — Seifried, O. — 1932 — Zur Histologie und histologischen Diagnostik der Virusschweinepest. *Münch. tierärztl. Wschr.*, 244-249.

16 — Seifried, O. and Cain, C. B. — 1932 — Histological Studies on Hog Cholera. II — Lesions of the Vascular System. III — Lesions in the various Organs. *J. Exp. Medicine*, 56. 345-349 e 351-362.

17 — Seifried, O. und Herbstreith, H. — 1934 — Zur Frage der diagnostischen Bedeutung der Lymphknotenveränderungen bei akuter Schweinepest. *Berl. Tierärtzl. Wschr.*, 230-232.

18 — Waldmann, O. — 1930 — Le diagnostic de la peste porcine. *Bull. mens. Off. internat. Épizooties*, 3. 737-752.

19 — Walkiewicz — cit. Michalka.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 49

Fig. *A* — Pulmão — Exudato constituido exclusivamente por celulas de tipo histiocitario.

Fig. *B* — Pulmão — Fóco de necróse recente. Conservação da estrutura alveolar.

Estampa 50

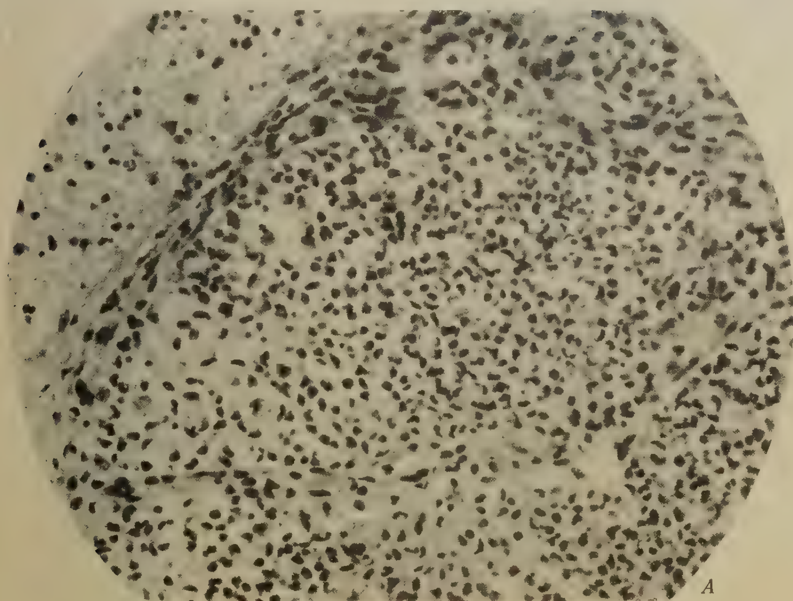
Fig. *C* — Pulmão — Fóco de necróse com intensa infiltração histiocitaria ao redor.

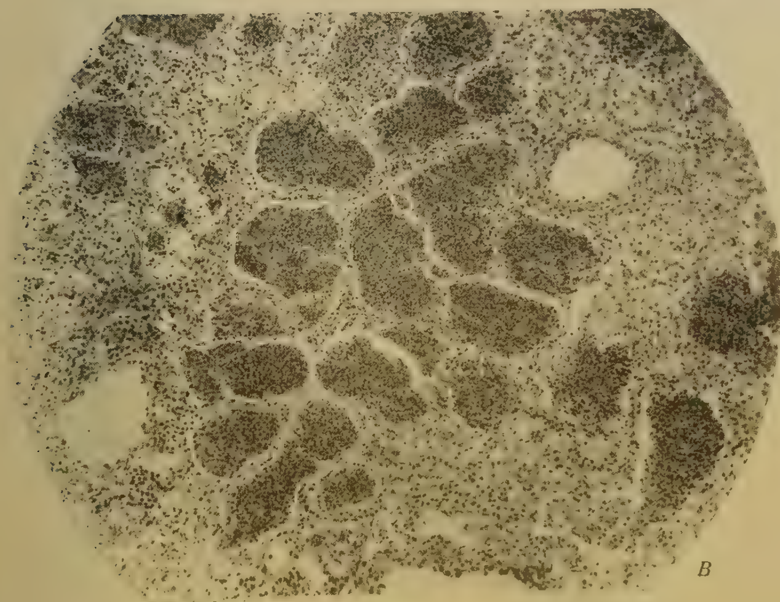
Fig. *D* — Pulmão — Infartos circundados por valos de nucleos picnoticos.

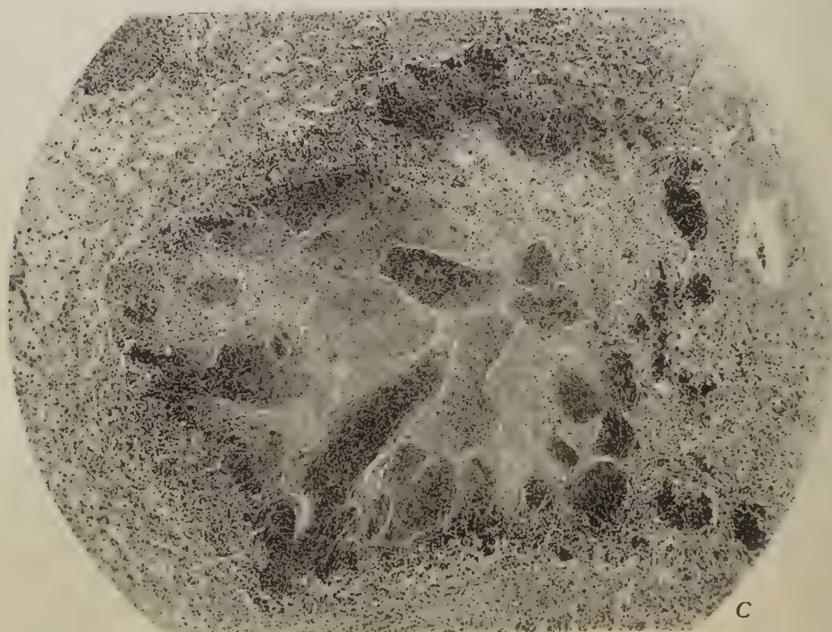
Estampa 51

Fig. *E* — Pulmão — Antigos fócos de necróse fortemente infiltrados por histiocitos.

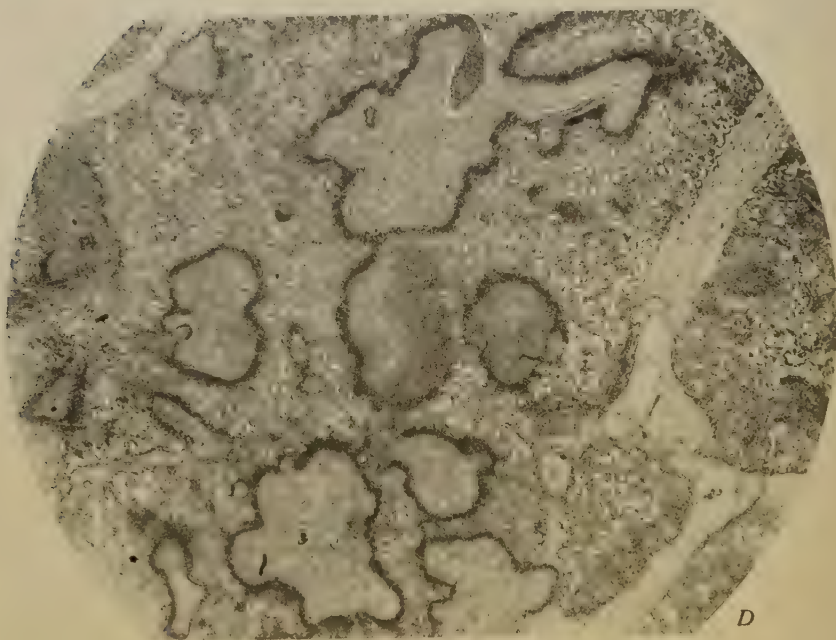



A

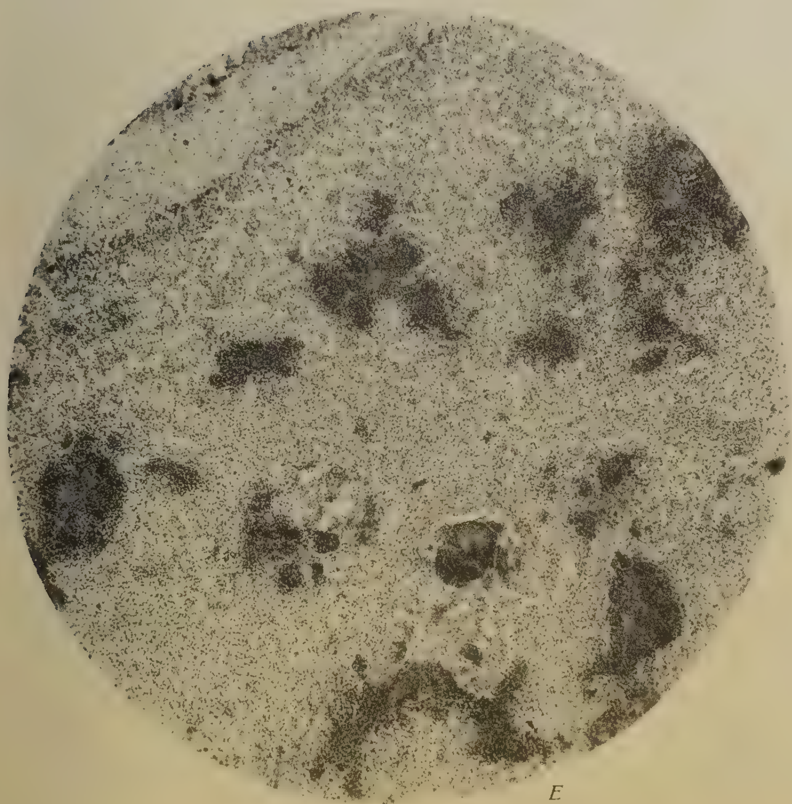

B



C



D


E

Vol. 12 — Art. 20 Novembro de 1941

RINOSPORIDIOSE EM MUAR

POR

P. Bueno e P. N. Faria

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 52-53

Denomina-se Rinosporidiose uma afecção mais comumente localisada na mucosa nasal, provocada por um fungo do genero *Rhinosporidium.*

Este parasita, pela primeira vez observado por SEEBER, e estudado por WERNICKE, na Argentina, que o incluiu entre os protozoarios, foi posteriormente reconhecido como um fungo e tomou a denominação de *Rhinosporidium seeberi.*

A doença tem sido observada com maior frequencia na especie humana, raramente em equinos e duas vezes assinalada em ruminantes.

O exame da literatura revela que a Rinosporidiose é doença de rara ocurrencia tanto assim que KARUNARATNE (4), em trabalho recente, estudando detidamente o assunto, referiu como descritos até hoje apenas 53 casos. F. DE ALMEIDA (1) verificou, no entanto, que varios casos descritos não haviam chegado ao conhecimento daquele autor, pelo que concluiu que mais de 60 casos já foram observados na especie humana e entre os animais.

Devemos ocupar-nos das observações feitas nestes ultimos e que são em pequeno numero. Em equinos sómente o caso de ZSCHOKKE (7), na Africa do Sul, que descreveu o *R. equi* encontrado num tumor da cavidade nasal, os dois casos que foram observados por QUINLAN e KOCK (5), em 1928, nos Estados Unidos e outro na India, em muar, segundo referencia de ASHWORTH (2).

Com relação á especie bovina existe uma unica observação, de WOLFHUEGEL e VOGELSANG (6), feita no Uruguay, ao passo que ASWORTH cita a observação de um caso de Rinosporidiose em caprino, na India.

Segundo F. DE ALMEIDA são conhecidos no Brasil apenas 2 casos de Rinosporidiose no homem. Não ha observação da doença em animais, a não ser a de CARINI (3), publicada nestes Arquivos, que relata o encontro de um parasita semelhante ao *Rhinosporidium,* formando quistos na péle do abdomen de duas "Hylas" por ele examinadas. Acentúa esse autor a grande semelhança existente não só entre os quistos como entre os espóros do parasita e do *Rhinosporidium,* opinando pela sua colocação no mesmo grupo. No entanto, dada a grande

distancia, na escala zoologica, dos animais hospedeiros e tambem a diferença de tamanho dos quistos e a sua localização cutanea, resolveu CARINI colocar provisoriamente tal parasita em novo genero, para o qual propoz o nome de *Dermosporidium*.

Sobre a observação do *Rhinosporidium* ou de parasitas semelhantes, em mamiferos, nada revela a nossa literatura.

Este é o motivo por que julgamos de interesse o relato da observação de um caso de Rinosporidiose em muar. Devemos no entanto acentuar de inicio que ele não nos parece autoctone, pois segundo as informações obtidas é o animal proveniente da Argentina; assim, esta referencia é justificada sómente pela raridade da observação e pelo fáto de não haver sido feita ainda entre nós, com relação á patologia veterinaria. Além do mais, é, pelo que demonstrou a literatura, a segunda observação feita em muar.

Passemos á descrição do caso.

Segundo o relato do proprietario do animal, foi este importado ha 4 anos mais ou menos, da Argentina. Foi transportado por via terrestre, atravessando os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, e, chegando a São Paulo, foi imediatamente remetido para uma fazenda, no municipio de Araras. Logo após a chegada, foi posto no trabalho. A principio nada foi nele notado que demonstrasse qualquer manifestação da doença. Sómente cerca de 6 meses, depois da sua chegada á fazenda, é que foi notada, principalmente após o exercicio, uma respiração ruidosa, que chamou a atenção dos tratadores. A causa era, segundo declaração deles, a existencia de uma formação tumoral localisada na parede interna da narina esquerda, proxima ao orificio externo. O animal foi operado por um pratico, e voltou a trabalhar. Durante dois anos o tumor recidivou e foi operado por mais duas vezes.

Recentemente um de nós (P. FARIA) foi chamado para fazer ablação da escrecencia que novamente se desenvolvera. O exame clinico revelou, além da dificuldade respiratoria, a presença, na fossa nasal esquerda, de um corrimento de aspéto catarral, denso, com muito muco e de côr branco-acinzentada. Após anestesia local, foi feita a ablação total da néoformação, juntamente com áreas do tecido visinho da periferia e das porções profundas.

O diagnostico macroscopico do material operatorio foi de um polipo simples da fossa nasal. Macroscopicamente, nada mais denotava o exame, além de ter a néoformação uma superficie irregular e mostrar, ao córte, uma estrutura pouco consistente, semelhante á de um papiloma.

A pesquiza histologica revelou tratar-se de um caso de Rinosporidiose. Naturalmente, quando estabelecemos tal diagnostico, baseámo-nos exclusivamente na morfologia do parasita, aliás base unica, mas suficientemente solida, que se dispõe para o reconhecimento, dado o seu caracter nitidamente diferenciavel dos de outros fungos.

Estudaremos aqui com alguns detalhes as alterações microscopicas encontradas.

Um pequeno aumento das preparações de córtes longitudinais da formação tumoral mostra o aspéto de um polipo, revestido por epitelio poliestratificado da mucosa nasal, tendo proliferações infiltradas profundamente no parenquima do tumor. Abaixo desta camada de revestimento epitelial encontra-se o tecido poliposo propriamente dito, que é constituido por estroma conjuntivo, fórtemente infiltrado em numerosos pontos por celulas de tipo histiocitario, linfocitos e eosinofilos e tendo em suas malhas enorme quantidade de parasitas em varios estadios de evolução e com os caracteristicos do *Rhinosporidium* (Estampa 52, fig. *A*). Conseguimos assinalar a presença do parasita tambem no seio das porções epiteliais, fáto já observado por KARUNARATNE e outros, que pretendem demonstrar assim uma possivel infestação atravez do epitelio. Na superficie do polipo encontrámos erosões das camadas superficiais, com infiltração das porções subjacentes por leucocitos neutrofilos e, em muitos pontos do parenquima tumoral, parasitas em degeneração, muitas vezes com as capsulas tambem invadidas por leucocitos neutrofilos e celulas de tipo histiocitario. Assinalámos, como refere KARUNARATNE, hemorragias recentes em varios pontos do polipo, porém, ao que nos parece, de origem traumatica.

Ocupemo-nos agora da questão referente á estrutura e á biologia do parasita, baseados na descrição de KARUNARATNE.

Segundo conceito já estabelecido, a forma mais jovem do parasita, o estado trófico, é uma celula redonda ou oval, de nucleo redondo, com protoplasma claro, e envolvida por uma membrana de quitina (Estampa 52, fig. *B*). Á medida que o parasita se desenvolve, aparecem granulos no citoplasma, e quando atinge 50 ou 60 micra de diametro, dão-se as primeiras divisões, que segundo ASWORTH são do tipo mitotico. Em estadios mais avançados do desenvolvimento do parasita, aparece uma camada semelhante á celulose na porção interna da membrana quitinosa e ao mesmo tempo se delineia o local correspondente á futura micropila. As divisões do nucleo prosseguem e quando atingem cerca de 2 mil elementos, começam a condensar-se em torno deles pequenas porções protoplasmaticas (Estampa 52, fig. *C*). Por fim um esporangio maduro

de 150 micra de diametro tem em seu interior aproximadamente 16.000 espóros que, quando tambem maduros, abrigam em seu citoplasma numerosos granulos refringentes (Estampa 52, fig. *D*). Dos espóros, sómente certo numero chega ao desenvolvimento completo, permanecendo os outros em estado de imaturidade (Estampa 53, fig. *E*). Por fim, a micropila ou póro do esporangio se rompe (Estampa 53, fig. *F*) e os espóros póstos em liberdade cáem na corrente linfatica e são levados aos espaços conjuntivos onde passam para o estado trófico, completando assim o ciclo.

A ruptura dos esporangios em porções proximas á superficie da mucosa determina a eliminação dos espóros para o exterior, em consequencia do que aparecem eles em enorme quantidade no corrimento nasal (Estampa 53, fig. *G*), podendo então dar-se a infestação de outros pontos atravez do epitelio, segundo a já referida opinião de alguns autores.

Com relação ás pesquizas sobre a cultivabilidade e a transmissibilidade experimental do parasita, demonstra a literatura que até hoje nada se conseguiu. Por um acaso, talvez feliz, pudémos verificar, recentemente, que houve recidiva do processo parasitario no animal por nós observado, o que permitirá que procedamos a pesquizas dirigidas naquele sentido.

RESUMO E CONCLUSÕES

É descrita a observação de um caso de Rinosporidiose em muar, fáto julgado de interesse dada a raridade da ocurrencia dessa doença em animais. Pela epoca da observação dos primeiros sintomas que coincide até certo ponto com a data da importação do animal, da Republica Argentina, ha possibilidades de não se tratar de um caso autoctone e sim de uma afecção contraída naquele país, onde a doença já foi observada.

RHINOSPORIDIOSIS IN A MULE.

Abstract

A case of Rhinosporidiosis, observed in a mule, is described.

BIBLIOGRAFIA

1 — ALMEIDA, F. — 1939 — *Mycologia medida* — 442-450.

2 — ASHWORTH — 1923 — *Trans. Roy. Soc. Edinburgh.*, 53. 301 (Cit. 3).

3 — CARINI, A. — 1940 — Sobre um parasito semelhante ao "Rhinosporidium" encontrado em quistos da pele de uma "Hyla". *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo. 11. 93-96.

4 — Karunaratne, W. A. E. — 1936 — The Pathology of Rhinosporidiosis. *The Journ. of Path. and Bact.*. 42. 193-202.

5 — Quinlan, J. and Kock, G. — 1928 — Two cases of Rhinosporidiosis in equines. *13 th and 14 th Reports of the Director of Vet. educ. and res. Pretoria.* 635-639 (Cit. 1).

6 — Wolfhuegel e Vogelsang (Cit. 1).

7 — Zschokke — 1913 — *Schweiz. Arch. f. Tierheilk.*, 1. 641 (Cit. 3).

---o---

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

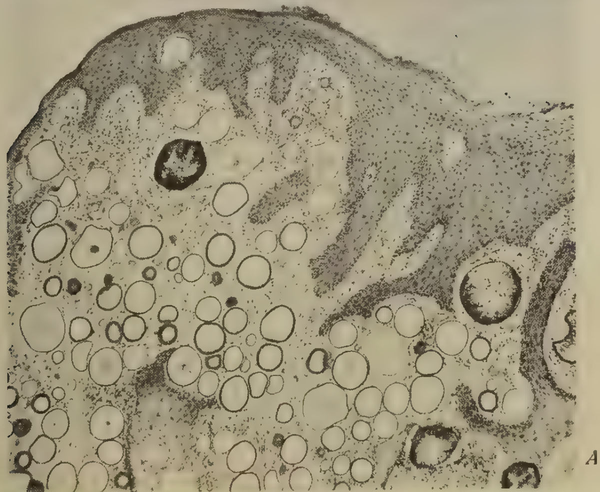
Estampa 52

Fig. *A* — Aspéto microscopico geral do polipo — (Aumento, 56 vezes).
Fig. *B* — Forma jovem do *Rinosporidium* — (Aumento, 450 vezes).
Fig. *C* — Esporangio com espóros em inicio de desenvolvimento — (Aumento, 190 vezes).
Fig. *D* — Espóros com granulos refringentes (gr.) no citoplasma — (Desenho esquematico, aumento, 1400 vezes).

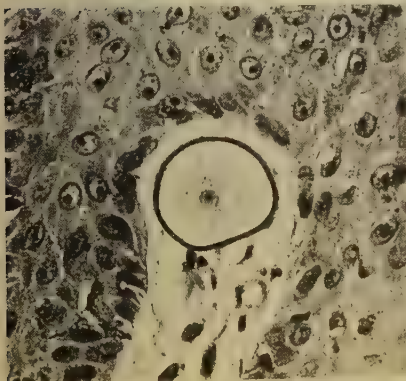
Estampa 53

Fig. *E* — Esporangio maduro contendo espóros completamente desenvolvidos ao lado de outros em estado de imaturidade. — (Aumento, 190 vezes).
Fig. *F* — Esporangio com micropila rompida — (Aumento, 190 vezes).
Fig. *G* — Enorme quantidade de espóros encontrados no corrimento nasal.

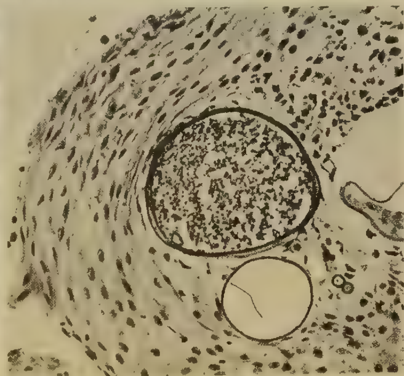
———o———



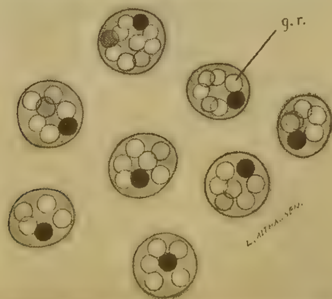
A



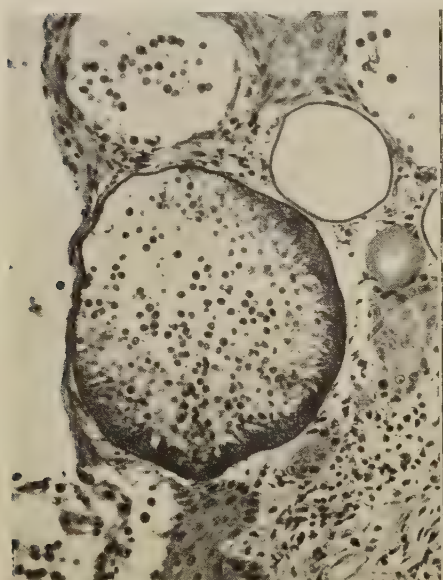
B



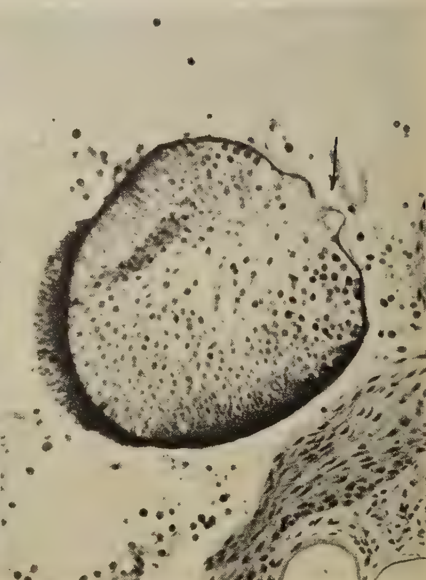
C



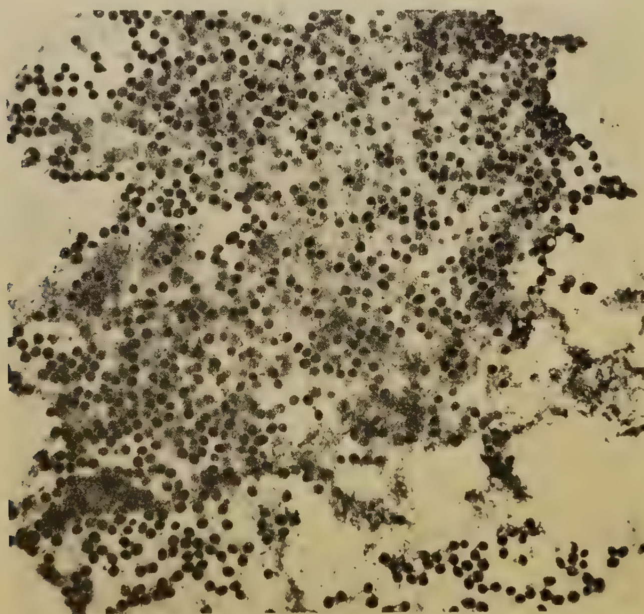
D



E



F



G

Vol. 12 — Art. 21 Novembro de 1941

TUBERCULOSE EM COATÍ (NASUA NARICA) DETERMINADA PELO BACILO DO TIPO BOVINO

POR

P. Nóbrega e J. Reis

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Casos de tuberculose em coatí já teem sido referidos na literatura. Assim, SMITH (3) descreve tuberculose do pulmão e mesentério em exemplar de *Nasua narica* em cuja história ha referência a contato com indivíduo tuberculoso. Posteriormente GRIFFITH (2) refere mais dois casos de tuberculose fibro-caseosa das membranas serosas, principalmente da cavidade peritonial, em animais conservados em cativeiro. Ambos os autores relacionam etiologicamente a doença observada com bacilos de origem humana.

Em 1936 tivemos ocasião de examinar um coatí, que foi apanhado já doente no mato, nos arredores de Conchas (Est. de S. Paulo), e que apresentava à autópsia um processo intenso de peritonite generalizada de natureza fibro-caseosa, com grande derrame peritonial constituido por um exsudato amarelado de consistência espessa e lesões pulmonares do tipo caseoso. O esfregaço do pulmão e do líquido peritonial corado pelo método de Ziehl demonstrou a existência de numerosos bacilos ácido-resistentes, que cultivados no meio de Petragnani forneceram cultura pura do bacilo da tuberculose. Julgamos interessante referir mais este caso de tuberculose em *Nasua narica*, não só porque este animal é muito raramente submetido à autópsia entre nós, mas tambem e principalmente porque o estudo morfológico, e sobretudo experimental, de amostra isolada, demonstrou tratar-se de amostra do tipo bovino.

Estudo da amostra isolada:

1) — Aspeto da cultura em caldo glicerinado a 4%.

A cultura da 1.ª, 2.ª e 3.ª gerações em caldo glicerinado a 4% apresenta crescimento muito pobre e forma apenas uma película delgada na superfície, de aspeto seco e esbranquiçado. Esta vegetação disgônica, que é frequente entre as amostras do tipo bovino, tem sido empregada como critério diferencial para distinguí-lo do tipo humano, que nas mesmas condições apresenta crescimento moderado ou luxuriante.

2) — Inoculação em coelhos.

A inoculação em coelhos constitue o critério mais seguro e eficiente para a diferenciação dos tipos humano e bovino de tuberculose.

Segundo PARK e KRUMWIEDE [cit. em CALMETTE (1)] quando se injetam coelhos endovenosamente com 0,01 mgr. da cultura de bacilo de tuberculose de 1.ª ou 2.ª geração, podem observar-se dois resultados diferentes segundo o tipo da cultura injetada: a) o tipo bovino já na dose de 0,01 mgr. pode determinar tuberculose generalizada com formação de tubérculos progressivos que conduzem à morte do animal; no pulmão os tubérculos ora são pequenos ora são maiores e confluentes com caseificação central; baço e fígado aumentados, às vezes com pequenos nódulos. Injetados com 1 mgr., os coelhos apresentam quadro geral semelhante e morrem uniformemente em menos de 30 dias; b) o tipo humano na dose de 0,01 mgr. nunca determina tuberculose generalizada progressiva; os coelhos inoculados com 1 mgr. sobrevivem 50 a 60 dias e só apresentam lesões nos pulmões e rins, sem que se observe todavia tendência acentuada para generalização.

Para identificação de nossa amostra seguimos em linhas gerais a técnica de PARK e KRUMWIEDE. Para isso partimos de cultura de segunda geração em meio de Petragnani, a qual foi secada em papel de filtro e pesada, depois de transferida para novo papel. Dez miligramas desse material foram suspensos em água destilada com carbonato de sódio a 10^{-4} para facilitar a homogenização; a suspensão foi colocada em frascos com pérolas de vidro e vascolejada em aparelho próprio durante 30 minutos.

Com a suspensão homogênea assim obtida injetamos 4 coelhos por via endovenosa, recebendo cada coelho a dose de 1 cc. (que correspondia a 1 miligrama de cultura). Outros 4 coelhos foram inoculados pela mesma via, com 1 cc. cada um, da mesma suspensão diluida a 1:100 (1 cc. = 0,01 mgr.).

A tabela abaixo mostra os resultados observados:

TABELA

Resultado da inoculação em coelhos, por via endovenosa, de uma amostra de bacilo da tuberculose isolada de um exemplar da *Nasua narica*.

Coelhos Nos.	Dose em mgrs.	Peso em grs. do animal em				Data da morte
		21-1-36 (data de inocul.)	1-2-36	21-2-36	5-3-36	
1	0,01	2.300	2.100	1.800	1.550	16-3-36
2	0,01	1.530	1.200			10-2-36
3	0,01	1.550	1.220			5-2-36
4	0,01	1.850	1.550	1.250		14-2-36
5	1	2.330	2.220			10-2-36
6	1	1.500	1.050			3-2-36
7	1	1.500				24-1-36 (*)
8	1	2.300	2.050	1.710		17-2-36

(*) Morte consequente a doença intercurrente.

Todos os coelhos, com exceção do n.º 7, que teve uma moléstia intercurrente, apresentavam à autópsia lesões nodulares extensas do pulmão, em geral grandes e com tendência à caseificação; no fígado e baço, que apresentavam lesões menores, observamos em alguns casos, macroscopicamente, apenas aumento do orgão, mas o exame microscópico revelou a existência de lesões tuberculosas. Em 2 coelhos, ao lado das lesões descritas, observamos exsudato fibrinoso abundante na pleura e peritônio.

A grande patogenicidade da amostra de coatí para coelhos nas doses indicadas, manifestando-se pela diminuição rápida de peso, morte de todos os animais dentro dum período médio de 24 dias após a inoculação, e lesões extensas à autópsia, aliadas ao aspéto da cultura em meio glicerinado, permite-nos concluir que se trata, no caso presente, duma tuberculose produzida pelo bacilo do tipo bovino.

Agradecemos ao Dr. Clemente Pereira, do I. Biológico de S. Paulo, a quem devemos o material examinado.

TUBERCULOSIS IN "NASUA NARICA"

Abstract

A case of spontaneous tuberculosis in Nasua narica is here reported, which was due to the bovine type of Mycobacterium tuberculosis.

BIBLIOGRAFIA

1 — Calmette A. — 1936 — *L'infection bacillaire et la tuberculose.* Ed. Masson (Paris) pp. 59-60.

2 — Griffith, A. S. — 1930 — Bacillus tuberculosis, *A system of Bacteriology,* 5. 215-216.

3 — Smith, Th. — 1897 — Two varieties of the tubercle bacillus from animals. *12th and 13th Ann. Rept. of the Bureau of Animal Industry,* Washington, pp. 149-161.

———o———

Vol. 12 — Art. 22 Novembro de 1941

ELIMINAÇÃO DA "PASTEURELLA AVICIDA" PELAS FEZES

POR

J. Reis

Do Instituto Biológico de S. Paulo

É noção encontradiça nos tratados e compêndios de veterinária, em geral, e de patologia aviária, em particular, serem as fezes dos animais doentes um dos principais veículos de disseminação da cólera.

Entretanto, não são abundantes nem concordes os estudos experimentais sobre tal assunto.

MÜLLER verificou ser possivel isolar das fezes de aves, o germe da cólera, 24 horas após a inoculação deste por via oral (doses maciças). Após este prazo não mais se encontrava a bactéria nas fezes. A partir da terceira semana, entretanto, o germe começava a eliminar-se pela urina, eliminação essa que podia perdurar longo tempo (até quatro meses!). Nestes casos tratava-se, naturalmente, de amostras muito pouco virulentas.

O mesmo pesquisador refere a possibilidade de reaparecer o germe nas fezes logo antes da morte, o que ocorreria nos casos, subagudos, em que a evolução mais lenta da doença désse tempo ao desenvolvimento de processo de enterite.

SCHILLING publicou observações feitas em coelhos, que mostram a possibilidade de encontrar-se o germe na urina, mas não nas fezes de animais experimentalmente infetados.

O presente trabalho reune observações que fizemos em experiências planejadas com o intuito de esclarecer a questão da eliminação da *Pasteurella avicida*.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de *P. avicida* usada foi sempre a mesma, fluorescente e de grande virulência, em culturas de 24 horas em caldo Hottinger. A via de inoculação foi a intramuscular em uns casos (dose: de 0,5 a 1 cc. de dil. a 0,1%) e a coanal em outros (0,5 cc. depositado diretamente na fenda palatina). Os animais de experiência eram frangos Leghorn brancos, mais ou menos de 500 grs. Depois de inoculados, estes animais eram colocados em gaiolas individuais, esterilizadas, forradas com papel de filtro esteril; o papel de filtro era retirado periodicamente e substituido por novo; do papel retirado recortavam-se as áreas onde havia fezes, triturando-se em gral, conjuntamente, os frag-

mentos de papel recortados e as fezes correspondentes. O material assim triturado era suspenso em 10 cc. de agua fisiológica, e dessa suspensão inoculavam-se 0,5 cc. em pombo, por via muscular.

Alguns dos frangos usados receberam, juntamente com a injeção virulenta, 4 cc. de suspensão oleosa a 20% de sulfanilamida.

RESULTADOS

Aves inoculadas por via intramuscular. Em três frangos inoculados no peito observamos que o germe só apareceu nas fezes na ocasião da morte, sobrevinda ao fim de 48, 120 e 216 horas, respetivamente. A hemocultura foi positiva em 24 horas no primeiro caso e em 48 nos outros dois; o muco bucal, em 28 horas no primeiro caso, e 96 nos outros dois. A diarréia foi sempre muito precoce, e apareceu muito antes da eliminação de germes (28 horas no primeiro caso, 48 nos dois últimos).

Não se verificou eliminação de germe nem no primeiro nem no segundo caso, pois o germe não foi isolado das fezes encontradas na gaiola em que os animais morreram, mas apenas das colhidas na cloaca dos cadáveres. No terceiro caso, de evolução mais lenta, o germe apareceu nas fezes momentos antes da morte, sendo eliminado com a última dejeção, apesar de haver o animal apresentado profusa diarréia mucosa a partir de 48 horas após inoculação.

Aves inoculadas por via intramuscular e simultaneamente tratadas com sulfanilamida. Em dois frangos que resistem à infecção, sem apresentar sinais mórbidos, o germe não se encontra, em momento algum, nas fezes, no sangue ou no muco da fenda palatina.

Em um frango que desenvolve doença lenta, nota-se que, apesar da hemocultura e do muco se mostrarem positivos 96 horas após inoculação, quando tambem sobrevem diarréia, não há eliminação do germe pelas fezes, as quais se apresentam livres dele até o momento da morte, que se dá ao fim de 240 horas.

Em dois frangos que sucumbem em 48 horas tambem não se verifica eliminação do germe pelas fezes.

Aves inoculadas per os. Nos três frangos, dos assim inoculados, que morreram (morte em 96, 120 e 168 horas respetivamente), o germe só foi encontrado nas fezes da cloaca dos cadáveres, mas nunca nas emitidas pelo animal até o instante da morte. O muco e a hemocultura revelam-se positivos 72 horas após inoculação, quando tambem começa a diarréia. Em um desses casos desenvolveu-se artrite tibio-társica específica, o que não é de observação comum.

Dois frangos que adoeceram e sararam, apresentaram hemocultura e muco positivos ao fim de 72 horas, esterilizando-se, porem, ao fim de longo tempo (cerca de dois mêses); as fezes sempre foram, porem, negativas.

Finalmente, um último frango apresentou doença de evolução muito protraida, sucumbindo ao fim de um mês; neste caso, as fezes se revelaram positivas, juntamente com o muco e a hemocultura, durante os primeiros 9 dias. Daí por diante só o muco permaneceu positivo, continuando assim até a morte, que sobreveiu após o estabelecimento de um quadro de meningo-encefalite, que durou seis dias.

ON THE PRESENCE OF "PASTEURELLA AVICIDA" IN THE FECES OF INFECTED BIRDS.

Abstract

This paper is a record of some observations concerning the elimination of the fowl cholera microorganism through the feces of birds experimentally infected either by intramuscular or by nasal route.

In only one out of nine cases was the microbe found in the feces passed just before death. In the remaining 8 birds the microbe was only encountered in the feces collected in the cloaca of the dead animals, but not in the feces passed while the birds were still alive. In all cases the blood and the nasal mucus were found to be infective very early in the course of the disease.

In two sulfanilamide-treated birds which developed disease but did not die, the microbe was not found, at any time, either in the blood and nasal mucus or in the feces.

In one very peculiar case, which developed a chronic type of disease which lasted for one month, the microbe was passed in the feces during the first 9 days, but not after that time. At the end of the disease the animal displayed marked symptons of meningo-encephalitis, which is a rather rare condition in fowl cholera.

One of the birds infected by mouth developed arthritis in the tibio-tarsal joint due to P. avicida.

BIBLIOGRAFIA

MÜLLER. J. — cit. por SCHILLING.

SCHILLING — 1922 — Ueber die Wirkung verschiedener Sera gegen Geflügelcholera nebst Untersuchungen über das Verweilen und die Ausscheidung des Infektionserregers im Tierkörper. *Monatsh. f. prakt. Tierhlk.*, 33, 47-60.

———o———

Vol. 12 — Art. 23 Novembro de 1941

PROCESSO PAPILOMATOSO DAS VIAS BILIARES DE "LEPTODACTYLUS OCELLATUS (L.)", DETERMINADO POR "CHOLEDOCYSTUS EUCHARIS", n. g., n. sp. (TREMATODA: PLAGIORCHIIDAE)

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 5 figuras no texto e estampas 54-57

Desde 1935 as rãs provenientes do rio Pinheiros (Capital) apresentavam nas vias biliares interessante trematoide, que se fazia acompanhar de processos proliferativos intensos ao nivel de sua localização, conduzindo geralmente à formação de dilatações volumosas, dentro das quais se abrigavam os parasitos.

Afim de se ter idéia das relações entre o parasito em questão e as proliferações papilomatosas apresentadas pelo hospedeiro, daremos uma relação das rãs examinadas, acompanhando-a dos respectivos achados de necrópsia, abrangendo apenas o material que serviu para a elaboração do presente trabalho.

30 exemplares de *L. ocellatus* examinados em janeiro de 1941:

Parasitados: 28; localização e papilomatose { só no colédoco — 26; no colédoco e na vesícula — 2

Não parasitados: 2; sem processos de papilomatose.

20 exemplares de *L. ocellatus* examinados em junho de 1941:

Parasitados: 20; localização e papilomatose { só no colédoco — 17; só na vesícula — 1; no colédoco e na vesícula — 2

30 exemplares de *L. ocellatus* examinados em outubro de 1941:

Parasitados: 29; localização e papilomatose { só no colédoco — 27; só na vesícula — 1; no colédoco e na vesícula — 1

Não parasitados: 1; sem processo de papilomatose.

Ao ser o fato devidamente estudado, verificou-se que o trematoide era uma espécie dos *Plagiorchiidae*, ainda desconhecida, cujos caracteres não permitiam sua inclusão em nenhum dos gêneros dessa família por nós conhecidos, motivo pelo qual resolvemos erigir um gênero novo para conter a nova espécie estudada.

Aproveitamos tambem a oportunidade para descrever o aspecto anátomo-patológico das proliferações papilomatosas consequentes à presença do parasito.

Choledocystus, n. g.

Plagiorchiidae de porte médio. Cutícula revestida de espinhos bastante desenvolvidos. Acetábulo pré-equatorial. Poro genital bifurcal, pré-acetabular. Bolsa do cirro grande, musculosa, alongada, geralmente encurvada, com vesícula seminal grande e numerosas glândulas prostáticas. Cirro longo. Metratermo curto e de paredes espessas. Útero descrevendo numerosas alças, com ramo posterior predominantemente dorsal e à direita e o recurrente ventral e à esquerda. Ovário intercecal, lateral, à direita da linha mediana, em parte na zona acetabular e com campo coincidente com o campo testicular direito. Ausência de espermatéca. Testículos com zonas coincidentes ou parcialmente coincidentes e campos afastados. Vitelogênios extracecais, dispostos em grupos de folículos relativamente volumosos, a partir do início da zona cecal, sem alcançar seu limite posterior. Faringe globoide. Prefaringe ausente. Esôfago longo, em T ou Y invertido. Cecos intestinais longos, indo até próximo da extremidade caudal. Poro excretor terminal. Vesícula excretora tubuliforme.

Espécie-tipo: *Choledocystus eucharis*, n. sp.

Diagnose diferencial: *Choledocystus*, n. g., aproxima-se bastante tanto de *Glypthelmis* STAFFORD, 1905 como de *Plagiorchis* LUEHE, 1899. Distingue-se do primeiro essencialmente pela ausência de espermateca, ao passo que, do segundo, afasta-o um grupo de caracteres, dentre os quais podemos salientar: a) menor relação entre os diâmetros longitudinal e transversal; b) extensão das alças uterinas até a zona acetabular; c) vitelogênios menos numerosos, não alcançando o limite posterior da zona cecal; d) poro genital bifurcal.

Choledocystus eucharis, n. sp.

Plagiorchiidae de porte médio, corpo achatado dorso-ventralmente e contorno variavel conforme o estado de contração, elíptico, oval, piriforme ou cordiforme, frequentemente apresentando um forte estrangulamento ao nivel da borda posterior da ventosa oral, de modo a ficar esta em um curto prolongamento cilíndrico anterior. Comprimento bastante variavel, largura máxima tambem variavel, geralmente em zona bastante posterior, correspondente à união dos 3/4 anteriores com o quarto posterior, raramente próximo à zona equatorial. Cutícula revestida por abundantes espinhos. O número de espinhos decresce da extremidade anterior para a posterior, variando suas dimensões em ordem inversa à do seu número. Os espinhos medem 8-12 micra, 20-24 micra e 28-33 micra, respectivamente, nas zonas anterior, média e posterior do corpo.

Acetábulo: ventral, mediano, preequatorial, mais ou menos na união do terço anterior com os 2/3 posteriores; de contorno circular, musculoso, com dimensões sensivelmente da mesma ordem que as da ventosa oral ou ligeiramente inferiores. Diâmetro acetabular variavel. Não revestido de espinhos.

Aparelho digestivo: ventosa oral, subterminal, ventral, musculosa, de contorno circular e diâmetro variavel, em geral da mesma ordem de tamanho que a do acetábulo ou ligeiramente superior. Não revestida de espinhos. Boca ventral, pequena, circular ou em fenda transversal. Faringe globoide, musculoso, de paredes espessas. Esôfago longo, em Y ou T invertido e de comprimento variavel. Cecos intestinais em geral delgados, longos, laterais, indo até próximo à extre-



Fig. 1 - *Choledocystus eucharis*, n. g. n. sp., total, em toto-montagem.

midade caudal, podendo porem apresentar dilatações consideraveis ao longo do seu trajeto. Glândulas digestivas unicelulares, em grande número, ao redor do faringe e do esôfago.

Aparelho excretor: poro excretor, terminal, de contorno circular. Vesícula excretora longa e tubuliforme, bifurcada acima dos testículos.

Aparelho genital: poro genital externo bifurcal, preequatorial, sobre a linha mediana ou ligeiramente deslocado para a esquerda. Átrio genital amplo, tendo numerosas glândulas unicelulares.

Aparelho genital ♂: testículos em número de dois, grandes, maiores que o ovário, de forma bastante variavel, ovoides ou elipsoides, mais raramente globoides, frequentemente com lobação externa bastante evidente, situados na área intercecal, post-acetabulares e post-ovarianos, aproximadamente na zona equatorial, em geral com zonas coincidentes ou pelo menos em grande parte coincidentes, e campos afastados; o testículo direito tem seu campo coincidente com o campo ovariano. Dimensões muito variaveis. Bolsa do cirro volumosa, arqueada em C, com concavidade voltada para a esquerda, musculosa e de dimensões bastante variaveis. Vesícula seminal grande, elipsoidal, de dimensões variaveis. Glândulas prostáticas abundantes, dispostas em torno do cirro. Cirro longo, rijo, apresentando um grande alargamento em sua extremidade terminal.

Aparelho genital ♀: ovário menor que os testículos, elipsoide, ovoide ou globoide, colocado na área intercecal, preequatorial, à direita do acetábulo, em geral com zona em grande parte coincidente com a zona acetabular e o campo coincidente com o campo testicular direito, com dimensões bastante variaveis. Útero muito longo, descrevendo numerosas alças que enchem toda a região do corpo compreendida entre a zona acetabular e a extremidade caudal, tendo o ramo posterior uma situação dorsal pronunciadamente à direita, e o recurrente, ventral e predominantemente à esquerda. Metratermo curto, ligeiramente encurvado, indo do acetábulo ao átrio genital.

Anexos ao aparelho genital feminino: Vitelogênios, constituidos por duas séries de folículos vitelínicos, mais ou menos volumosos, dispostos de cada lado, nas áreas extracecais. Um dos exemplares apresentou uma anomalia, constituida pela existência de folículos vitelínicos de um só lado; o número de folículos era bem maior que o normal, mas não correspondia a uma superposição dos vitelogênios dos dois lados, pois havia apenas um viteloduto, tendo antes as caraterísticas de uma hipertrofia compensadora. Glândula de Mehlis presente, globoide, junto ao ovário. Espermatéca ausente. Ovos longos, elipsoidais, de 33-37 micra de comprimento e 12-15 micra de largura, de casca muito fina e fragil.

Hospedeiro: *Leptodactylus ocellatus* (L.)

Procedência: São Paulo (Pinheiros). Estado de São Paulo. Brasil.

Localização: vias biliares, determinando intensos processos de papilomatose; os helmintos localizam-se preferentemente na porção distal do colédoco, junto à sua abertura no duodeno. Em alguns casos vamos encontrá-los concomitantemente na vesícula biliar, e só muito raramente parasitam exclusivamente este órgão. E' interessante assinalar o fato de servir a presença deste helminto, de estímulo para o aparecimento de um processo local de papilomatose, verificavel tanto

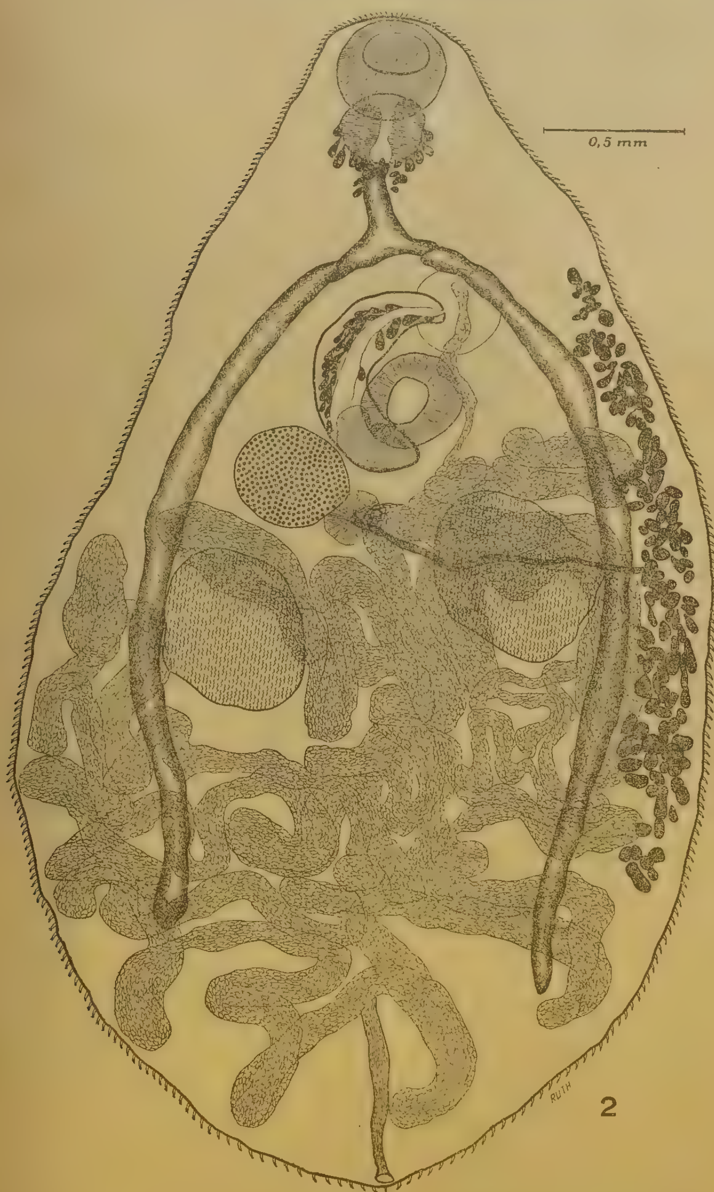


Fig. 2 - *Choledocystus eucharis*, n. g. n. sp., total, com agenesia do vitelogênio direito.

na sua localização vesicular como ao nivel do colédoco; esta última situação é particularmente interessante, por se acompanhar geralmente a citada proliferação papilomatosa da elaboração de uma ampola ou mesmo de um verdadeiro apêndice sacular justaterminal do colédoco, dentro do qual se abrigam os parasitos. E' como se estes, quando em grande número, incitassem a diferenciação de um verdadeiro orgão derivado do colédoco, que passaria a servir de localização típica para os parasitos.

Este é um exemplo excelente de profunda adaptação morfológica entre o hospedeiro e seu parasito, conduzindo a um "modus-vivendi" inteiramente excepcional no que diz respeito ao parasitismo nos animais.

Anátomo-patologia da reação de *L. ocellatus* ao parasitismo por *C. eucharis*.

Macroscopicamente — À simples inspeção, após abertura do animal, revela-se a presença da dilatação sacciforme ou fusiforme na porção distal do colédoco, junto à sua abertura na alça duodenal. Mais frequentemente essa dilatação tem aspeto sacciforme ou piriforme com grande polo obtuso voltado para o fígado e outro estreitado, à maneira de curto canal, que se põe em comunicação com o tubo intestinal. Na porção mais estreitada vem-se abrir a parte do colédoco não atingida pela papilomatose, geralmente muito curta, pouco abaixo do ponto de união do cístico ao hepático. Mais raramente tal dilatação assume a forma de um fuso tendo em uma das extremidades a abertura da porção sã do colédoco e na outra seu orifício duodenal; ainda menos frequentemente essa dilatação apresenta-se como um saco apenso ao colédoco, a meia distância entre sua abertura no duodeno e sua origem na união do cístico ao hepático.

Seu tamanho é muito variavel e relacionado evidentemente com o grau de parasitismo e com o tempo de infestação helmíntica. Em casos iniciais de parasitismo e nos casos em que o animal abriga pequeno número de helmintos, a dilatação é de tamanho muito discreto; em outros casos, porem, ela atinge dimensões relativamente grandes, alcançando diâmetros da ordem de 10-12 mm., tornando-se bem maior que a vesícula biliar e com diâmetro superior ao do duodeno.

Apresenta coloração branco-amarelada, em geral clara, não contrastando de maneira evidente com a do colédoco normal. E' relativamente consistente e pouco deprimivel a pressões discretas. Sua presença não constitue obstáculo evidente à passagem da bile, pois pequenas pressões exercidas sobre a vesícula biliar acarretam seu franco esvasiamento, tingindo-se de verde em tais condições não só o colédoco, como tambem a massa tumoral e as porções circunvizinhas do duodeno. A vesícula biliar, quando parasitada, quer isolada quer concomitantemente com a porção distal do colédoco, apresenta consideravel aumento de volume; devido ao grande espessamento de suas paredes, a coloração de tonalidade esverdeada escura, que normalmente lhe é comunicada por transparência pela bile, atenua-se muito, chegando mesmo a vesícula biliar a assumir uma coloração branco-amarelada nos casos de parasitismo intenso. Em tais circunstâncias a vesícula biliar perde consideravelmente a sua capacidade de contração, permanecendo com tamanho mais ou menos constante.

À disseção notamos, ainda macroscopicamente, tanto na vesícula parasitada como na porção bulbosa distal do colédoco, grande número de pregas, alternadas com depressões mais ou menos profundas, da mucosa. Em casos de parasitismo



Fig 3 - *Choledocystus eucharis*, n. g. n. sp., total, com um pequeno testículo supranumerário.

pouco intenso ou nos seus estádios primários, esses acidentes da mucosa são muito pouco acentuados ao exame macroscópico, notando-se apenas ligeira rugosidade que a torna caraterísticamente áspera. O pregueamento da mucosa é a

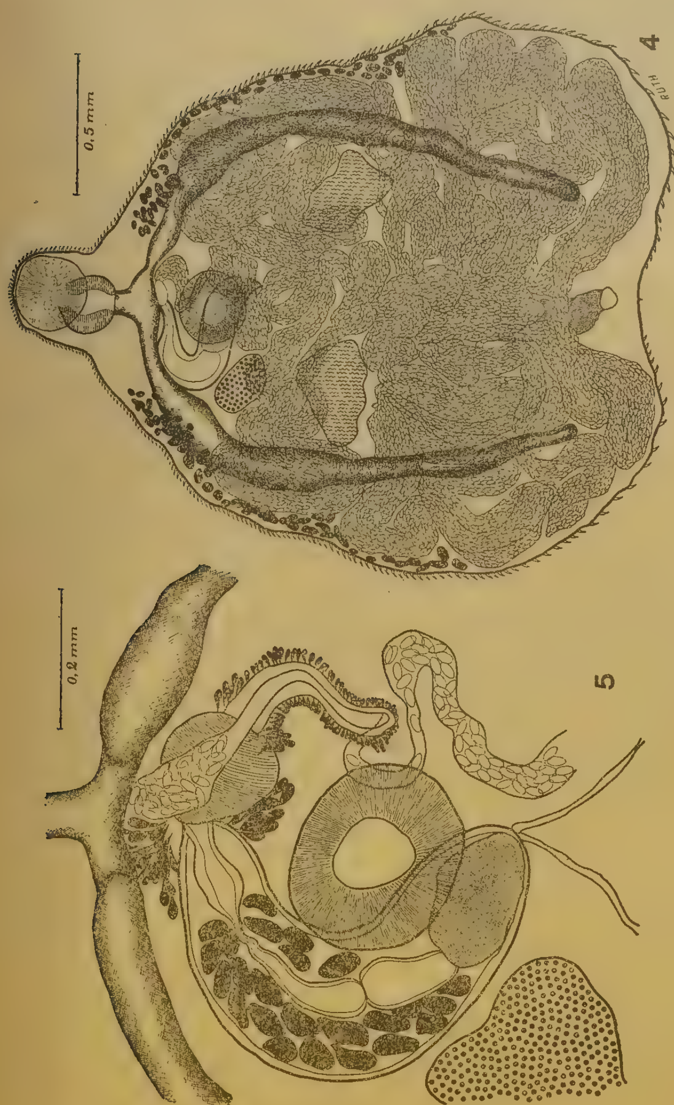
tradução do processo papilomatoso que se demonstra ao exame histológico. Tais pregas não são simples, ramificam-se, entrando frequentemente suas expansões em coalescência umas com as outras, do que resulta o aparecimento de verdadeiras lojas, onde vamos encontrar abrigados os parasitos.

Microscopicamente — Nos casos iniciais ou de parasitismo discreto notamos pequenos papilomas formados à custa da proliferação mais ou menos intensa do epitélio cilíndrico simples da mucosa da vesícula biliar ou da porção distal do colédoco. No início, esses papilomas são formados por pequenas elevações pediculadas e bulbosas em sua extremidade livre, constituidas por um esqueleto conjuntivo, desenvolvido à custa da membrana basal, e revestidas por epitélio cilíndrico alto, com núcleo elipsoide e de situação basal. O epitélio de revestimento dos papilomas guarda em tudo o aspeto normal do epitélio das vias biliares; não ha polimorfismo celular nem figuras de mitose. O corpo do papiloma apresenta infiltração celular, porem não exagerada e representada predominantemente por eosinófilos. Notamos ainda no corpo do papiloma a presença de grande número de fibroblastos, dispostos no sentido do seu maior eixo.

Nos casos mais acentuados os papilomas passam a emitir expansões, que exibem o mesmo carater geral dos papilomas iniciais, que lhes deram origem, inclusive na regularidade da morfologia celular e na constituição do infiltrado. Essas novas expansões vão, por sua vez, emitindo outras, e assim por diante, devendo-se notar, entretanto, que as caraterísticas morfológicas iniciais são sempre conservadas, pois em nenhum caso deparamos com polimorfismo ou figuras de degeneração celular; tambem o infiltrado celular no corpo das massas papilomatosas sempre se apresentou de maneira discreta. Finalmente, nos estádios mais adiantados do processo ou nos em que o número de helmintos nas vias biliares era extremamente grande, encontramos uma papilomatose generalizada da porção distal do colédoco, bem como da vesícula biliar quando tambem esta se encontrava parasitada.

A proliferação papilomatosa da vesícula biliar era tão intensa em dois dos casos que, ao lado do consideravel aumento de volume do orgão, sua luz se encontrava praticamente obliterada pelo processo, pois grande número de formações papilomatosas havia entrado em coalescência franca, do que resultava passarem a constituir um corpo comum. Das íntimas relações entre os prolongamentos papilomatosos resulta a formação de verdadeiras lojas, nas quais são encontrados os parasitos. Os cortes histológicos mostram, frequentemente, no interior do corpo dos papilomas, cordões epiteliais massiços, formados por células cilíndricas de núcleo elipsoidal, e que correspondem a projeções papilomatosas apanhadas tangencialmente. Notamos ainda a presença de vasos de neoformação no interior dos prolongamentos papilomatosos, por vezes muito dilatados e abarrotados de hemácias.

Como acabamos de verificar, a evolução do processo conduz à individualização de um verdadeiro órgão novo na parte distal do colédoco, onde se vão abrigar os parasitos. Consultando a bibliografia sobre o assunto não encontramos caso algum semelhante ao que acaba de ser descrito. Em nenhum caso em que o parasitismo acarreta o desenvolvimento de papilomas ou de estados papilomatosos, o processo neoplásico leva ao desenvolvimento de uma grande dilatação, que se isola praticamente, tornando-se mais ou menos independente da por-



Choledocystus eucharis, n. g. n. sp. Fig. 4 - Exemplar pequeno. Fig. 5 - Porção terminal do aparelho genital.

ção normal do órgão do hospedeiro, de modo a acarretar, finalmente o desenvolvimento de um verdadeiro órgão novo no animal parasitado.

Os cortes histológicos do pâncreas mostraram em alguns animais parasitados a presença de ovos do helminto no interior dos ductos intra-pancreáticos, o que pode ser explicado pelas íntimas relações que os ductos pancreáticos da rã teem com o colédoco. Nesses casos, em

Tabela I: medidas em mm de um lote de dez exemplares pequenos

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
comprimento			2,180	2,560	2,670	2,400	2,560	1,900	2,070	1,420	2,450	2,290
largura máxima			1,850	1,960	1,690	1,850	1,850	1,300	1,470	1,200	1,690	1,630
distância entre a borda posterior da ventosa oral e a borda anterior do acetábulo			0,323	0,484	0,525	0,404	0,484	0,343	0,363	0,246	0,484	0,363
diâmetro acetabular			0,205	0,238	0,205	0,222	0,242	0,207	0,202	0,164	0,214	0,205
ventosa oral			0.221	0,246	0,246	0,262	0,262	0,207	0,222	0,164	0,246	0,246
faringe		comprimento	0,162	0,189	0,180	0,179	0,181	0,149	0,140	0,120	0,160	0,162
		largura	0,164	0,197	0,180	0,181	0,181	0,153	0,142	0,123	0,164	0,164
esôfago			0,123	0,164	0,180	0,140	0,164	0,121	0,140	0,115	0,123	0,140
testículos	direito	comprimento	0,363	0,243	0,328	0,343	0,323	0,243	0,303	0,246	0,246	0,323
		largura	0,204	0,202	0,180	0,202	0,180	0,202	0,180	0,197	0,189	0,180
	esquerdo	comprimento	0,383	0,303	0,295	0,344	0,323	0,242	0,304	0,246	0,287	0.295
		largura	0,261	0,202	0,197	0,202	0,161	0,181	0,161	0,221	0,221	0,181
bolsa do cirro		comprimento	0,698	0,698	0,616	0,646	0,641	0,606	0,616	0,534	0,680	0,680
		largura	0,123	0,140	0,123	0,141	0,141	0,140	1,141	0,098	0,140	0,142
vesícula seminal		comprimento	0,205	0,213	0,213	0,181	0,188	0,180	0,205	0,181	0,205	0,205
		largura	0,100	0,101	0,100	0,100	0,101	0,100	0,101	0,100	0,101	0,100
comprimento do cirro			0,370	0,404	0,370	0,363	0,372	0,370	0.370	0,376	0,378	0,372
ovário		comprimento	0,221	0,205	0,221	0,242	0,221	0,205	0,181	0,164	0,197	0,205
		largura	0,140	0,205	0,180	0,180	0,161	0,140	0,161	0,115	0,172	0,180

Tabela II: medidas em mm de um lote de dez exemplares grandes

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
comprimento		3,440	3,220	2,780	3,270	2,790	3,220	3,160	3,380	3,260	3,210
largura máxima		1,900	2,020	1,700	1,960	1,810	2,070	1,900	2,180	1,960	1,960
distância entre a borda posterior da ventosa oral e a borda anterior do acetábulo		0,818	0,654	0,490	0,600	0,490	0,654	0,600	0,654	0,763	0,709
diâmetro acetabular		0,262	0,323	0,282	0,282	0,282	0,282	0,282	0,323	0,282	0,262
ventosa oral		0,303	0,323	0,303	0,363	0,283	0,343	0,323	0,363	0,343	0,323
faringe	comprimento	0,181	0,181	0,181	0,222	0,246	0,242	0,222	0,242	0,202	0,242
	largura	0,202	0,242	0,202	0,262	0,279	0,202	0,222	0,222	0,181	0,213
esôfago		0,254	0,202	0,181	0,202	0,205	0,222	0,162	0,262	0,222	0,181
testículos direito	comprimento	0,545	0,444	0,464	0,505	0,525	0,484	0,505	0,545	0,545	0,525
	largura	0,363	0,380	0,404	0,424	0,383	0,444	0,444	0,484	0,404	0,424
testículos esquerdo	comprimento	0,565	0,404	0,404	0,464	0,424	0,545	0,424	0,545	0,424	0,525
	largura	0,303	0,323	0,303	0,404	0,323	0,303	0,323	0,404	0,404	0,404
bolsa do cirro	comprimento	0,763	0,727	0,698	0,686	0,787	0,727	0,690	0,727	0,780	0,698
	largura	0,202	0,181	0,205	0,222	0,222	0,222	0,230	0,222	0,181	0,230
vesícula seminal	comprimento	0,213	0,202	0,205	0,205	0,205	0,202	0,202	0,205	0,205	0,202
	largura	0,130	0,121	0,123	0,121	0,128	0,123	0,131	0,130	0,121	0,131
comprimento do cirro		0,428	0,424	0,431	0,430	0,444	0,428	0,419	0,430	0,444	0,428
ovário	comprimento	0,363	0,323	0,363	0,424	0,343	0,363	0,383	0,343	0,343	0,343
	largura	0,323	0,282	0,282	0,242	0,303	0,303	0,303	0,343	0,343	0,303

torno dos ovos encontramos áreas mais ou menos extensas de necrose de coagulação, relacionadas talvez com substâncias tóxicas eliminadas por eles.

Os cortes de tubo intestinal, particularmente da porção do duodeno próxima da abertura do colédoco, mostraram uma intensa eosi-

nofilia, mesmo nos casos em que o *Choledocystus eucharis* era o único helminto encontrado em *Leptodactylus ocellatus*, o que depõe ainda a favor da ação irritante das secreções deste parasito.

PAPILLOMATOUS PROCESS ON THE BILIARY DUCTS OF "LEPTODACTYLUS OCELLATUS (L.)" DETERMINED BY "CHOLEDOCYSTUS EUCHARIS", N. G. N. SP.

(TREMATODA: PLAGIORCHIIDAE)

Abstract

Choledocystus, n. g., with C. eucharis, n. sp. as type species, from biliary ducts of Leptodactylus ocellatus (L.), is allied to Glypthelmis Stafford, 1905, and Plagiorchis Luehe, 1899. The new genus differs from the former by the absence of spermatheca, and from the latter: a) by a lesser ratio between longitudinal and transverse diameters; b) by the reaching of the acetabular zone by the uterine loops: c) by less numerous vitellaria which do not reach the posterior range of the coecal zone: d) by the genital pore being bifurcal.

The presence of the parasite determines the growing of a papillomatous process of the walls mostly of choledochus and less frequently of the gall-bladder. This condition ends by a characteristic enlargement of the biliary ducts, frequently excentric, which feigns a "new organ" in which the parasites are located.

BIBLIOGRAFIA

BAER, J. G. — 1924 — Description of a new genus of Lepodermatidae (Trematoda) with a systematic essay on the family. *Parasitol.* **16**, 22-31.

CABALLERO, E. — 1938 — Revision y clave de las especies del genero Glypthelms. *An. Inst. Biol.* **9**, (1/2), 121-149.

DOLFUSS, R. Ph. — 1932 — Sur un Lepoderma de batraciens anoures de l'Ile Maurice. *Ann. Parasitol.* **10**, (6), 509-513.

FREITAS, J. F. T. — 1941 — Sobre alguns trematódeos de rãs. *Rev. Brasil. Biol.* **1** (1), 31-40.

HARWOOD, P. D. — 1932 — The helminths parasitic in the Amphibia and Reptilia of Houston, Texas, and vicinity. *Proc. U. S. Nat. Mus.* **81**, 1-17.

INGLES, L. G. — 1936 — Worm parasites of California amphibia. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **55** (1), 73-92.

JOHNSTON, L. J. — 1912 — On some Trematodes Parasites of australian Frogs. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* **37**, 285-362.

LUEHE, M. F. — 1899 — Zur Kenntnis einiger Distomen. *Zool. Anz.* **22**, 524-539.

LUEHE, M. F. — 1901 — Zwei neue Distomen aus indischen Anuren. *Central. f. Bakteriol. Parasit. u. Infekt. Jena I. Abt.* **30** (4), 166-177.

LUTZ, A. — 1928 — Estudios sobre trematodes observados en Venezuela. *Estudios de Zoologia y Parasitologia Venezolanas.* 101-125.

MACY, R. W. — 1931 — New bat trematodes of the genera Plagiorchis, Lianatulum and Dicrocoelium. *Journ. Parasitol.* 18, 28-33.

MC MULLEN, D. B. — 1937 — A discussion of the taxonomy of the Family Plagiorchiidae Luehe, 1901, and related Trematodes. *Journ. Parasitol.* 23 (3), 244-258.

MEHRA, H. R. — 1937 — Certain new and already known distomes of the family Lepodermatidae Odhner (Trematoda), with a discussion on the classification of the family. *Zeit. Parasitenk.* 9 (4), 429-469.

MILLER, E. L. — 1930 — Studies on Glypthelmis quieta Stafford. *Journ. Parasitol.* 21 (4), 237-243.

OLSEN, O. W. — 1937 — A systematic study of the trematode subfamily Plagiorchiidae Pratt, 1902. *Trans. Amer. Micr. Soc.* 56 (3), 311-339.

STAFFORD, J. — 1905 — Trematodes from canadian vertebrates. *Zool. Anz.* 28, 691-694.

TRAVASSOS, L. — 1924 — Contribuições para o conhecimento dos helminthos dos batraquios do Brasil I. Trematodes intestinais. *Sc. Med.* 2 (11), 618-628.

TRAVASSOS, L. — 1926 — Trematodeos novos: V. *Bol. Biol.*, S. Paulo, (1), 16-20.

WALTON, A. C. — 1939 — The trematodes as parasites of Amphibia. *Contr. from the Biolog. Lab. of Knox College* Nos.: 61, 62 e 63.

———o———

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Choledocystus eucharis, n. g., n. sp.

Estampa 54

Fig. *A* — Cisto sacciforme do colédoco com parasitos.
Fig. *B* — Cisto sacciforme do colédoco e vesícula biliar, ambos com parasitos, vendo-se mais o fígado e o duodeno.
Fig. *C* — Cisto fusiforme do colédoco com parasitos, vendo-se mais: duodeno, fígado, vesícula biliar, canais cístico e hepático.

Estampa 55

Fig. *D* — Dissecção do conjunto duodeno - colédoco - cístico - vesícula; no colédoco, muito alargado, veem-se as lojas dos parasitos; o aspeto rugoso da vesícula, traduz uma colecístite parasitária.
Fig. *E* — Aspecto papilomatoso de um cisto do colédoco.

Estampa 56

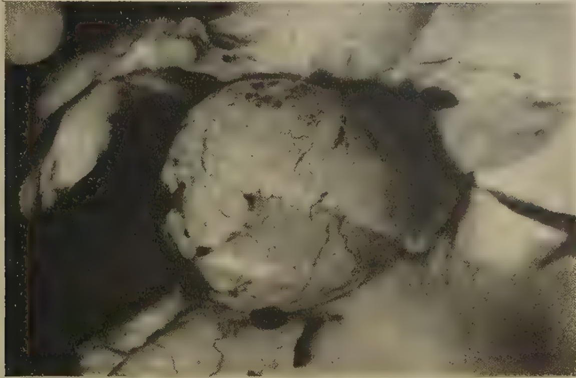
Fig. *F* — Pequenos papilomas do colédoco, de um caso inicial de parasitismo.
Fig. *G* — Corte abrangendo o duodeno, um cisto do colédoco com seus parasitos e processo papilomatoso, e um fragmento de pâncreas.

Estampa 57

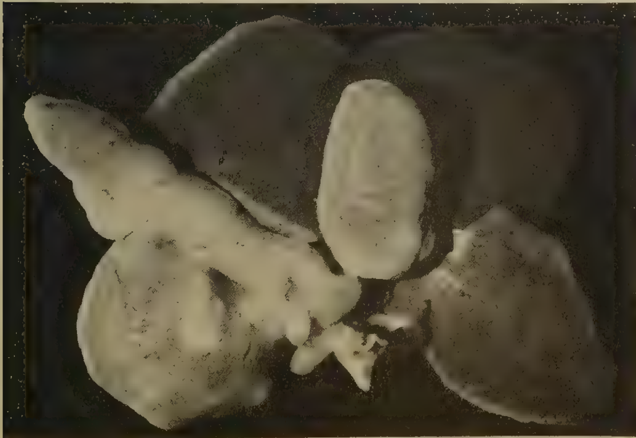
Fig. *H* — Corte do processo papilomatoso de um cisto do colédoco, mostrando os parasitos em suas lojas.
Fig. *I* — Detalhe de uma projeção papilomatosa.

(A. Federman fot.)

———o———



A



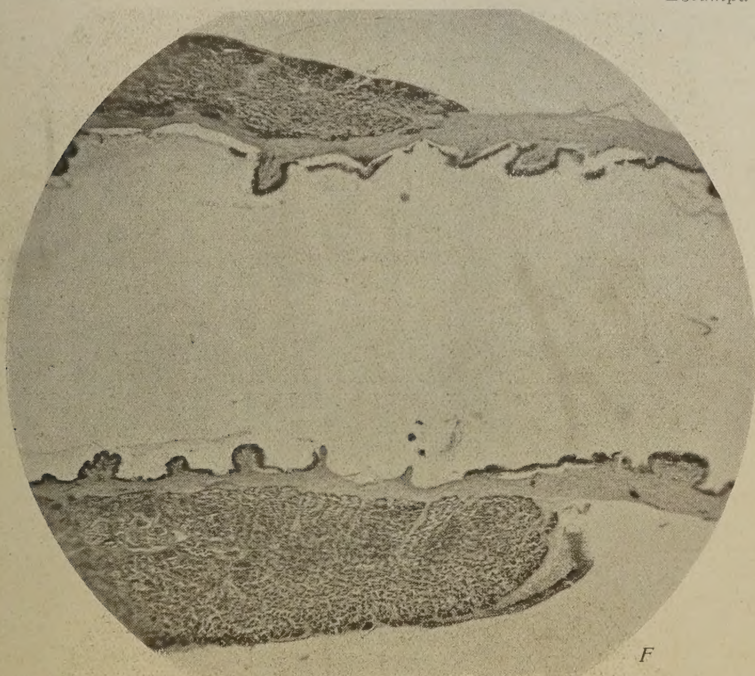
B



C



E



F



G


H


I

SÃO PAULO
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
RUA 15 NOVEMBRO, 201
1941